(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112912510 A
(43)申请公布日 2021.06.04

(21)申请号 201980070706.6
(22)申请日 2019.10.28
(30)优先权数据
10-2018-0129090 2018.10.26 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/014256 2019.10.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/085879 KO 2020.04.30
(71)申请人 庆尚国立大学校产学协力团
地址 韩国庆尚南道
申请人 庆北大学校产学协力团
(72)发明人 金善元 郑圣熹 金景镇
Z·巴赫特
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
C12P 7/62(2006.01)
C12N 9/10(2006.01)
C12N 15/52(2006.01)

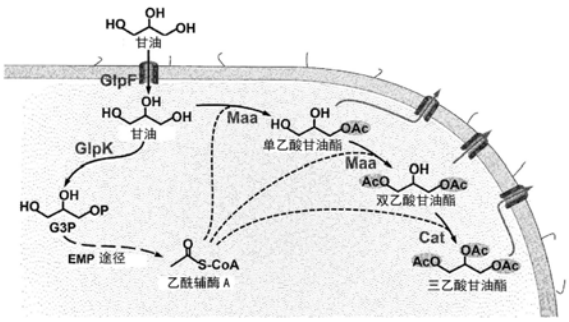
权利要求书3页 说明书21页
序列表39页 附图11页

(54)发明名称

用于生物生产乙酸甘油酯化合物的方法

(57)摘要

本发明涉及通过使用O-乙酰转移酶将乙酰基转移至甘油而生物生产单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯、或三乙酸甘油酯的方法，并且涉及获得可持续的、不造成环境污染的、并且安全的更好品质的乙酸甘油酯的方法和组合物。



CN 112912510 A

1.一种用于生产乙酸甘油酯的方法,其包括在第一O-乙酰转移酶的存在下将乙酰辅酶A与甘油反应,以获得单乙酸甘油酯或双乙酸甘油酯。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述第一O-乙酰转移酶是麦芽糖O-乙酰转移酶。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,在所述第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸是天冬酰胺(ASN),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸是谷氨酸(GLU)。

4.根据权利要求3所述的方法,其中,在所述第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述第一O-乙酰转移酶由SEQ ID NO:1至6中的任何一个序列构成。

6.根据权利要求1所述的方法,其还包括在氯霉素-O-乙酰转移酶或第二O-乙酰转移酶的存在下将作为反应产物的双乙酸甘油酯与乙酰辅酶A反应,由此获得三乙酸甘油酯。

7.根据权利要求6所述的方法,其中,在所述第二O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)。

8.根据权利要求6所述的方法,其中所述氯霉素-O-乙酰转移酶由SEQ ID NO:7的序列构成,而所述第二O-乙酰转移酶由SEQ ID NO:8至10中的任何一个序列构成。

9.一种用于生产乙酸甘油酯的方法,其包括在含有甘油的培养基中培养表达编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述第一O-乙酰转移酶是麦芽糖O-乙酰转移酶。

11.根据权利要求9所述的方法,其中,在所述第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸是天冬酰胺(ASN),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸是谷氨酸(GLU)。

12.根据权利要求9所述的方法,其中,在所述第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE),在对应于

SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)。

13.根据权利要求9所述的方法，其中所述编码第一O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:16至21中的任何一个序列构成。

14.根据权利要求9所述的方法，其中所述微生物还表达编码将乙酰基转移至双乙酸甘油酯的氯霉素-O-乙酰转移酶或第二O-乙酰转移酶的基因。

15.根据权利要求14所述的方法，其中，在所述第二O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)。

16.根据权利要求14所述的方法，其中编码氯霉素-O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:24的序列构成，而编码第二O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:25至27中的任何一个序列构成。

17.根据权利要求9所述的方法，其中所述微生物包括减弱或缺失了的编码乙酰酯酶的基因。

18.根据权利要求9所述的方法，其中所述微生物还表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶和甘油-3-磷酸酶(“DL-甘油-3-磷酸酶”)的基因，并且所述培养基包含葡萄糖。

19.一种用于生产乙酸甘油酯的组合物，其包含表达编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物。

20.根据权利要求19所述的组合物，其中所述第一O-乙酰转移酶是麦芽糖O-乙酰转移酶。

21.根据权利要求19所述的组合物，其中，在所述第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸是天冬酰胺(ASN)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸是谷氨酸(GLU)。

22.根据权利要求19所述的组合物，其中，在所述第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)

或酪氨酸(TYR)。

23.根据权利要求19所述的组合物,其中所述编码第一O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:16至21中的任何一个序列构成。

24.根据权利要求19所述的组合物,其中所述微生物还表达编码将乙酰基转移至双乙酸甘油酯的氯霉素-O-乙酰转移酶或第二O-乙酰转移酶的基因。

25.根据权利要求24所述的组合物,其中,在所述第二O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)。

26.根据权利要求24所述的组合物,其中所述编码氯霉素-O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:24的序列构成,而所述编码第二O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:25至27中的任何一个序列构成。

27.根据权利要求19所述的组合物,其中所述微生物包括减弱或缺失了的编码乙酰酯酶的基因。

28.根据权利要求19所述的组合物,其中所述微生物还表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的基因。

用于生物生产乙酸甘油酯化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生产乙酸甘油酯(acetin)化合物的方法和用于生产乙酸甘油酯的组合物。

背景技术

[0002] 乙酸甘油酯是一种其中乙酰基与甘油的羟基(-OH)酯连接的物质,并且根据连接的乙酰基的数目,分为具有一个键合的乙酰基的单乙酸甘油酯(monoacetin)、具有两个键合的乙酰基的双乙酸甘油酯(diacetin)、和具有三个键合的乙酰基的三乙酸甘油酯(triacetin)。特别地,三乙酸甘油酯也被称为甘油三乙酸酯或甘油三酸酯1,2,3-三乙酰氧基丙烷。

[0003] 乙酰甘油酯用作食品添加剂,例如香料溶剂和润湿剂,还用作制药工业中的保湿剂、增塑剂和溶剂。三乙酸甘油酯可用作抗爆剂,以减少汽油发动机的爆震,并可用作燃料添加剂以改善生物柴油的低温和粘度特性。为了使用废甘油即大量产生的副产物生产可用作生物柴油的燃料添加剂的乙酸甘油酯,本领域提供了一种技术,该技术能够实现零废物的概念,为了减少或回收废物或副产品,其目前正成为生物提炼业一个热门话题。根据前五(5)名烟草公司发布的1994年报告,三乙酸甘油酯是一种烟草添加剂,在制造烟草过滤嘴的过程中还用作增塑剂。此外,三乙酸甘油酯还用作人造太空食品的重要成分,可为执行长期太空飞行任务的宇航员提供所需能量的一半以上。美国食品药品监督管理局(FDA)认可三乙酸甘油酯是一种非常安全的食品添加剂(“公认安全:GRAS”)。

[0004] 同时,乙酸甘油酯材料是粘稠、无色和无味的液体。现有的乙酸甘油酯材料是人工合成的化学材料,其中乙酸或乙酸酐通过化学反应与甘油结合。

[0005] 没有公开生产乙酸甘油酯的生物方法。然而,持续需要通过生物工艺生产乙酸甘油酯材料的方法,从而在不引起任何环境问题的同时,安全且具有更优异的品质。

[0006] 本发明人发现,乙酸甘油酯化合物可以使用通过酯化反应将乙酰基结合至甘油或甘油的衍生物的酶的生物学方式来生产,并且使用甘油作为天然碳源从一些肠道细菌(肠杆菌科(Enterobacteriaceae))中生产微量的单乙酸甘油酯。

[0007] 因此,本发明人已制备了能够使用甘油或葡萄糖作为起始底物来生产单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯、和三乙酸甘油酯的重组微生物,并且已经完成了本发明(图1和2)。

发明内容

[0008] 发明要解决的问题

[0009] 本发明的目的是提供一种用于生物生产乙酸甘油酯化合物的方法以及用于生产乙酸甘油酯化合物的组合物。

[0010] 用于解决问题的方案

[0011] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案。

[0012] 1.一种用于生产乙酸甘油酯的方法,其包括在第一O-乙酰转移酶的存在下将乙酰

辅酶A与甘油反应，以获得单乙酸甘油酯或双乙酸甘油酯。

[0013] 2.根据上述1所述的方法，其中所述第一O-乙酰转移酶是麦芽糖O-乙酰转移酶。

[0014] 3.根据上述1所述的方法，其中，在所述第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸是天冬酰胺(ASN)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸是谷氨酸(GLU)。

[0015] 4.根据上述3所述的方法，其中，在所述第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)。

[0016] 5.根据上述1所述的方法，其中所述第一O-乙酰转移酶由SEQ ID NO:1至6中的任何一个序列构成。

[0017] 6.根据上述1所述的方法，其还包括在氯霉素-O-乙酰转移酶或第二O-乙酰转移酶的存在下将作为反应产物的双乙酸甘油酯与乙酰辅酶A反应，由此获得三乙酸甘油酯。

[0018] 7.根据上述6所述的方法，其中，在所述第二O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU)，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)。

[0019] 8.根据6所述的方法，其中所述第二O-乙酰转移酶由SEQ ID NO:7至10中的任何一个序列构成。

[0020] 9.一种用于生产乙酸甘油酯的方法，其包括在含有甘油的培养基中培养表达编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物。

[0021] 10.根据上述9所述的方法，其中所述第一O-乙酰转移酶是麦芽糖O-乙酰转移酶。

[0022] 11.根据上述9所述的方法，其中，在所述第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸是天冬酰胺(ASN)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸是谷氨酸(GLU)。

[0023] 12.根据上述9所述的方法，其中，在所述第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE)，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN)，

在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)。

[0024] 13.根据上述9所述的方法,其中所述编码第一O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:16至21中的任何一个序列构成。

[0025] 14.根据上述9所述的方法,其中所述微生物还表达编码将乙酰基转移至双乙酸甘油酯的第二O-乙酰转移酶的基因。

[0026] 15.根据上述14所述的方法,其中,在所述第二O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)。

[0027] 16.根据上述14所述的方法,其中编码第二O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:24至27中的任何一个序列构成。

[0028] 17.根据上述9所述的方法,其中所述微生物包括减弱或缺失了的编码乙酰酯酶的基因。

[0029] 18.根据上述9所述的方法,其中所述微生物还表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶和甘油-3-磷酸酶(“DL-甘油-3-磷酸酶”)的基因,并且所述培养基包含葡萄糖。

[0030] 19.一种用于生产乙酸甘油酯的组合物,其包含表达编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物。

[0031] 20.根据上述19所述的组合物,其中所述第一O-乙酰转移酶是麦芽糖O-乙酰转移酶。

[0032] 21.根据上述19所述的组合物,其中,在所述第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸是天冬酰胺(ASN),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸是谷氨酸(GLU)。

[0033] 22.根据上述19所述的组合物,其中,在所述第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸是酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)。

[0034] 23.根据上述19所述的组合物,其中所述编码第一O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID

NO:16至21中的任何一个序列构成。

[0035] 24.根据上述19所述的组合物,其中所述微生物还表达编码将乙酰基转移至双乙酸甘油酯的第二O-乙酰转移酶的基因。

[0036] 25.根据上述24所述的组合物,其中,在所述第二O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU),在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸是组氨酸(HIS)。

[0037] 26.根据24所述的组合物,其中所述编码第二O-乙酰转移酶的基因由SEQ ID NO:24至27中的任何一个序列构成。

[0038] 27.根据上述19所述的组合物,其中所述微生物包含减弱(attenuated)或缺失了的编码乙酰酯酶的基因。

[0039] 28.根据上述19所述的方法,其中所述微生物还表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的基因。

[0040] 发明的效果

[0041] 根据本发明,提供一种用于通过生物工艺生产乙酸甘油酯材料的方法,从而所生产的乙酸甘油酯材料是可持续的和安全的,并且在不造成环境污染的同时具有更优异的品质。

附图说明

[0042] 图1显示其中引入细胞的甘油转化为单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯和三乙酸甘油酯的途径。

[0043] 图2显示其中引入细胞的葡萄糖转化为单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯和三乙酸甘油酯的途径。

[0044] 图3:(A)是质粒pMD1至pMD8的结构图,所述质粒通过以下来制备:在大肠杆菌(E.coli)中选择能够将乙酰基转移至甘油的O-乙酰转移酶候选基因以产生单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯,并且克隆各基因至pTrc99A表达载体;(B)是显示在用(A)的质粒转化的重组大肠杆菌DH-MD1至DH-MD8中单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的生产率的比较的图(DH-MD0显示用空载体pTrc99A转化的大肠杆菌);(C)是质粒pMD9至pMD13的结构图,所述质粒通过以下来制备:选择源自其他微生物的候选基因,基于大肠杆菌麦芽糖O-乙酰转移酶(Maa)的结构和氨基酸序列推定所述候选基因可将乙酰基转移至甘油,然后克隆各基因至pTrc99A表达载体;(D)是显示在用上述质粒转化的重组大肠杆菌DH-MD9至DH-MD13中单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的生产率的比较的图。

[0045] 图4:(A)是质粒pMD13、pMD14和pMDT1的结构图,所述质粒通过克隆具有最高的单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯生产率的枯草芽孢杆菌(B.subtilis)的Maa基因(Bs-maa)至pTrc99A、pET28a和pSTV28表达载体而制备;(B)是显示在用上述质粒转化的重组大肠杆菌

DH-MD13、DH-MD14和DH-MDT1中的单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯和三乙酸甘油酯的生产率比较的图；(C)是显示各重组大肠杆菌的菌株增殖的比较的图。

[0046] 图5：(A)是气相色谱图，显示单乙酸甘油酯(1)、双乙酸甘油酯(2)和三乙酸甘油酯(3)的混合标准化合物(STD)和用乙酸乙酯提取重组大肠杆菌DH-MD06、DH-MD8和DH-MDT1后的这些重组大肠杆菌的培养基的GC分析；(B)是显示通过GC-MS将各样品中获得的单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯、和三乙酸甘油酯的质谱与STD的质谱的比较的图。

[0047] 图6：(A)是质粒pMDT2的结构图，所述质粒通过克隆将双乙酸甘油酯转化为三乙酸甘油酯的氯霉素-O-乙酰转移酶基因(cat)和枯草芽孢杆菌Maa基因(Bs-maa)至pTrc99A表达载体而制备；(B)和(C)是分别显示用上述质粒转化的重组大肠杆菌DH-MDT2与对照DH-MDT1的乙酸甘油酯复合物的生产率和构成组成的比较的图；(D)显示重组大肠杆菌DH-MDT2中的乙酸甘油酯复合物的生产率随培养时间的变化。

[0048] 图7：(A)是质粒pMDT2至pMDT7的结构图，所述质粒通过以下来制备：在各种微生物中发现候选基因，基于氯霉素O-乙酰转移酶的结构和氨基酸序列推定所述候选基因将乙酰基转移至双乙酸甘油酯，然后，将其克隆至质粒pMD13；(B)是显示用上述质粒转化的重组菌株DH-MDT2至DH-MDT7的乙酸甘油酯复合物的生产量的比较的图；(C)是显示重组菌株的菌株增殖的比较的图。

[0049] 图8是显示乙酸甘油酯复合物的生产率与大肠杆菌菌种和甘油浓度的比较的图，其中：(A)显示通过培养重组大肠杆菌DH-MDT2、AC-MDT2、BW-MDT2、W3-MDT2和MG-MDT2的乙酸甘油酯复合物的生产率的比较，所述重组大肠杆菌是用质粒pMDT2转化大肠杆菌DH5α、AceCo、BW25113、W3110和MG1655而得到的；(B)显示上述重组大肠杆菌的菌株增殖的比较；(C)显示重组菌株MG-MDT2的培养物中乙酸甘油酯复合物的生产率与甘油浓度的关系；(D)显示上述菌株的菌株增殖与甘油浓度的比较。

[0050] 图9显示通过在大肠杆菌BW25113中扩增和缺失乙酰酯酶基因(aes)观察到的乙酸甘油酯化合物的变化，其中：(A)和(B)显示接种重组菌株BW-空和BW-Aes BW25113后三乙酸甘油酯降解模式的观察，所述菌株在含有加入其中的15g/L的三乙酸甘油酯标准化合物的2YT培养基中分别用pTr99A和pTAes转化；(C)显示通过培养重组菌株BW-MDT2和BW-MDT2(Daes)的乙酸甘油酯复合物的生产率的比较，所述重组菌株在含有加入其中的10％(v/v)的甘油的2YT培养基中分别用质粒pMDT2转化BW25113和aes基因缺失的JW0465菌株而得到；(D)显示上述重组菌株的菌株增殖的比较。

[0051] 图10：(A)是质粒pMDT8的结构图，所述质粒通过在pMDT2质粒中克隆酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)来源的甘油生产基因Sc-gpd1和Sc-gpp2以从葡萄糖生产乙酸甘油酯复合物来制备；(B)显示从用上述质粒转化的重组大肠杆菌DH-MDT8的葡萄糖生产乙酸甘油酯复合物；(C)显示大肠杆菌的菌株增殖；(D)显示培养基的pH变化。

[0052] 图11显示BsMAA麦芽糖乙酰转移酶中的底物结合位点的结构，其中甘油乙酰化的关键残基是在氨基酸序列的位置70的天冬氨酸(ASP)、位置84的天冬酰胺(ASN)、位置114的组氨酸(HIS)、位置126的谷氨酸(GLU)。

[0053] 图12显示枯草芽孢杆菌MAA样酶的序列比对结果。

[0054] 图13显示CAT氯霉素-O-乙酰转移酶中底物结合位点的结构，其中双乙酸甘油酯乙酰化的关键残基是在氨基酸序列的位置102的苯丙氨酸(PHE)、位置143的苯丙氨酸(PHE)、

位置193的组氨酸(HIS)。在这方面,可以用具有相似性质的氨基酸例如异亮氨酸(ILE)和酪氨酸(TYR)分别替换在序列的位置102和143的残基。这可以在图14中的第二O-乙酰转移酶的氨基酸序列比对的比较中看出。

[0055] 图14显示CAT样酶的序列比对结果。

具体实施方式

[0056] 在下文中,将详细描述本发明。

[0057] 本发明涉及一种用于生产乙酸甘油酯的方法,其包括:在第一O-乙酰转移酶的存在下将乙酰辅酶A与甘油反应,以获得单乙酸甘油酯或双乙酸甘油酯。

[0058] 第一O-乙酰转移酶可以将乙酰辅酶A中的O-乙酰基转移至甘油,并且可以是例如麦芽糖O-乙酰转移酶,但不限于此。

[0059] 第一O-乙酰转移酶可以是源自生物体或可以是合成的。

[0060] 此外,第一O-乙酰转移酶可以在具有编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物中表达,并且微生物中编码第一O-乙酰转移酶的基因可以是相应微生物固有的,或者可以通过基因工程技术从外部引入微生物中。在这种情况下,甘油和乙酰辅酶A可以在微生物中反应,但不限于此。

[0061] 乙酸甘油酯可包含单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯或三乙酸甘油酯,或其组合。

[0062] 第一O-乙酰转移酶可在甘油和乙酰辅酶A反应产生单乙酸甘油酯中起到催化剂的作用,并且在第一O-乙酰转移酶的存在下单乙酸甘油酯可与乙酰辅酶A再次反应,从而生产双乙酸甘油酯,但不限于此。

[0063] 在第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸是天冬氨酸(ASP)。同样,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸可以是天冬酰胺(ASN);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸可以是组氨酸(HIS);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸可以是谷氨酸(GLU),但不限于此。

[0064] 此外,在第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸可以是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE)。同样,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸可以是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸可以是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸可以是酪氨酸(TYR);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),但不限于此。

[0065] 酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE),其是在对应于第一O-乙酰转移酶的SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸;同样,精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN),其是在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸;精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS),其是在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸;酪氨酸(TYR),其是在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸;和苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),其是在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸,上述氨基酸都是残基,其各自形成底物结合袋(substrate binding pocket),相对保守(relatively

well-preserved)，并在生产乙酸甘油酯中发挥重要作用。

[0066] 天冬氨酸(ASP)，其是在对应于第一O-乙酰转移酶的SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸；同样，天冬酰胺(ASN)，其是在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸；和谷氨酸(GLU)，其是在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸，上述氨基酸都是氨基酸残基，其各自使甘油稳定化，相对保守，并在生产乙酸甘油酯中发挥重要作用。

[0067] 组氨酸(HIS)，其是在对应于第一O-乙酰转移酶的SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸，是作为催化剂的残基，相对保守，并对应于在生产乙酸甘油酯中发挥重要作用的氨基酸残基。

[0068] 此外，第一O-乙酰转移酶的氨基酸序列可与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有50％以上的同源性。

[0069] 麦芽糖O-乙酰转移酶可包括，例如：大肠杆菌(Escherichia coli)的麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:1)；肉葡萄球菌(Staphylococcus carnosus)的麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:2)；咸海洋盐碱球菌(Halalkalicoccus jeotgali)的麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:3)；短乳杆菌(Lactobacillus brevis)的麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:4)；枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:5)；或恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)的麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:6)，优选枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶，但不限于此。

[0070] 大肠杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)与枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)具有65％的同源性，而肉葡萄球菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)与枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)具有58％的同源性。此外，咸海洋盐碱球菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)与枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)具有53％的同源性，而短乳杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)与枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)具有55％的同源性。此外，恶臭假单胞菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)与枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)具有50％的同源性。

[0071] 此外，根据本发明的用于生产乙酸甘油酯的方法可进一步包括在第二O-乙酰转移酶的存在下将反应产物即双乙酸甘油酯与乙酰辅酶A反应。

[0072] 在第二O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸可以是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(LEU)；同样，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE)；在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)；在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)；在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸可以是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU)；在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸可以是组氨酸(HIS)，但不限于此。

[0073] 第二O-乙酰转移酶可通过将乙酰基转移至双乙酸甘油酯来产生三乙酸甘油酯，并且可以包括，例如，氯霉素-O-乙酰转移酶，但不限于此。

[0074] 氯霉素-O-乙酰转移酶可以由例如SEQ ID NO:7的氨基酸序列构成,但不限于此。

[0075] SEQ ID NO:7的氯霉素-O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:7)可以,例如,在以下中表达:具有耐氯霉素抗生素标记的pSTV28载体;具有耐氯霉素抗生素标记的微生物;或其中固有地包含或获得pSTV 28载体的微生物,或者可以合成制备,但不限于此。

[0076] 当甘油与乙酰辅酶A在第一O-乙酰转移酶和第二O-乙酰转移酶的存在下反应时,可以产生单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯和三乙酸甘油酯的复合物,但不限于此。

[0077] 第二O-乙酰转移酶是氯霉素-O-乙酰转移酶,或具有与其相似的蛋白序列和结构,从而将乙酰基转移至双乙酸甘油酯并生产三乙酸甘油酯。

[0078] 第二O-乙酰转移酶可以在具有编码第二O-乙酰转移酶的基因的微生物中表达,并且微生物中编码第二O-乙酰转移酶的基因可以是微生物固有的,或通过基因工程技术从外部引入微生物中,在这方面,甘油和乙酰辅酶A可在微生物中反应,但不限于此。

[0079] 第二O-乙酰转移酶可以源自生物体或可以是合成的。

[0080] 在第二O-乙酰转移酶中,在作为对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸的半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(EU);同样,在作为对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置93的位置处的氨基酸的苏氨酸(THR)或脯氨酸(PRO);在作为对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸的苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE);在作为对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸的苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR);在作为对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸的苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸;或在作为对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸的缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU)中的任一种可以是形成底物结合袋的残基,相对保守,并对应于在生产乙酸甘油酯中发挥重要作用的氨基酸残基。

[0081] 在第二O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的组氨酸(HIS)是用作催化剂的残基,相对保守,并对应于在生产乙酸甘油酯中发挥重要作用的氨基酸残基。

[0082] 此外,第二O-乙酰转移酶的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有32%以上的同源性。

[0083] 具体地,第二O-乙酰转移酶可包括:SEQ ID NO:7的氯霉素-O-乙酰转移酶;蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)的O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:8);铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)的O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:9);或丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylicum)的O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:10);优选蜡样芽孢杆菌的O-乙酰转移酶,但不限于此。

[0084] 蜡样芽孢杆菌的O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)与氯霉素-O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)具有43%以上的同源性,而铜绿假单胞菌的O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:9)与氯霉素-O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)具有62%的同源性。此外,丙酮丁醇梭菌的O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)与氯霉素-O-乙酰转移酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)具有32%的同源性。

[0085] 此外,根据本发明的用于生产乙酸甘油酯的方法可进一步包括使葡萄糖与甘油-3-磷酸脱氢酶和甘油3-磷酸酶(即,DL-甘油-3-磷酸酶)依次反应,以制备上述甘油。

[0086] 上述甘油可通过生物合成来使葡萄糖与酶反应而获得,对于具体实例,甘油可通

过使葡萄糖与甘油-3-磷酸脱氢酶(GPD1)和DL-甘油-3-磷酸酶(GPP2)依次反应而获得,但不限于此。

[0087] 在这方面,甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶可以化学合成。

[0088] 此外,甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶可以在具有编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的基因的微生物中表达。本文中,编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的基因可以是相应微生物固有的。可选地,编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的基因也可以通过基因工程技术从外部引入微生物中。在这种情况下,甘油可以从微生物的葡萄糖获得,但不限于此。

[0089] 甘油-3-磷酸脱氢酶可具有不同的氨基酸序列,这取决于微生物的类型,并且可以是任何的脱氢酶,只要其可以将相应微生物中作为糖酵解途径的中间代谢物的磷酸甘油酮(DHAP)转化为3-磷酸甘油(glycerol-3-phosphate,G3P)即可。例如,在酿酒酵母的情况下,可以使用SEQ ID NO:14的酿酒酵母的甘油-3-磷酸脱氢酶(GPD1),但不限于此。

[0090] 上述DL-甘油-3-磷酸酶可具有不同的氨基酸序列,这取决于微生物的类型,并且可以是任何的磷酸酶,只要其可以将相应微生物中作为糖酵解途径的中间代谢物的3-磷酸甘油(G3P)转化为甘油即可。例如,在酿酒酵母的情况下,可以使用SEQ ID NO:15的酿酒酵母的DL-甘油-3-磷酸酶(GPP2),但不限于此。

[0091] 葡萄糖可以通过糖酵解途径(Embden-Meyerhof途径)形成作为中间代谢物的磷酸甘油酮(DHAP),并且磷酸甘油酮可与甘油-3-磷酸脱氢酶反应,以转化为3-磷酸甘油。此外,3-磷酸甘油(G3P)可与DL-甘油-3-磷酸酶反应,从而制备甘油,但不限于此。

[0092] 此外,本发明涉及一种用于生产乙酸甘油酯的方法,其包括在含有甘油的培养基中培养表达编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物。

[0093] 在第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸可以是天冬氨酸(ASP);同样,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸可以是天冬酰胺(ASN);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸可以是组氨酸(HIS);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸可以是谷氨酸(GLU),但不限于此。

[0094] 此外,在第一O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸可以是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE);同样,在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸可以是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸可以是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸可以是酪氨酸(TYR);在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR),但不限于此。

[0095] 此外,第一O-乙酰转移酶的氨基酸序列可与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有50%以上的同源性。

[0096] 编码第一O-乙酰转移酶的基因可以是,例如,编码麦芽糖O-乙酰转移酶的基因,并且编码麦芽糖O-乙酰转移酶的基因可包括,例如,编码大肠杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(maa,SEQ ID NO:16)、编码肉葡萄球菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Sc-maa,SEQ ID NO:17)、编码咸海洋盐碱球菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Hj-maa,SEQ ID NO:18)、编码

短乳杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Lb-maa,SEQ ID NO:19)、编码枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Bs-maa,SEQ ID NO:20)、或编码恶臭假单胞菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Pp-maa,SEQ ID NO:21),优选编码枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因,但不限于此。

[0097] 微生物可培养于表达第一O-乙酰转移酶的培养基中,并且第一O-乙酰转移酶可催化甘油与乙酰辅酶A反应以生产单乙酸甘油酯。此外,第一O-乙酰转移酶可再次催化单乙酸甘油酯与乙酰辅酶A反应,以生产双乙酸甘油酯。

[0098] 微生物的使用不限于此,只要其是表达第一O-乙酰转移酶的微生物即可,并且可以是,例如,可在液体培养基中培养的原核细胞、真核细胞、或分离的动物细胞。微生物可包括,例如,细菌、真菌或其组合。细菌可包括,例如,革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌或其组合。革兰氏阴性细菌可以是大肠杆菌属。革兰氏阳性细菌可以是芽孢杆菌属(Bacillus genus)、棒杆菌属(Corynebacterium genus)、乳酸菌等,或其组合。真菌可以是酿酒酵母、克鲁勃菌(Kluberomyces)等,或其组合。微生物具体地可以是大肠杆菌,更具体地,可以是DH5α、DH5α(DE3)、AceCo、BW25113、W3110或MG1655。在大肠杆菌的生产率方面,微生物优选为DH5α(DE3)、BW25113、W3110或MG1655,并且更优选MG1655,但不限于此。

[0099] 微生物可以是天然具有编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物,以及通过生物技术的技术诸如转化和转导等来获得和保持基因的微生物,但不限于此。

[0100] 可以通过将重组质粒引入微生物来实现转化,并且重组质粒可以是在载体中编码第一O-乙酰转移酶的基因,但不限于此。

[0101] 载体可包括,例如,pTrc99A(SEQ ID NO:78)、pET28a(SEQ ID NO:79)或pSTV28(SEQ ID NO:77),并且优选pSTV28,但不限于此。

[0102] 当插入基因时,载体和基因可以被限制性内切酶切割,并用连接酶连接,然后克隆,但不限于此。

[0103] 培养基是一种旨在维持类似于自然环境的营养状态的物质,在其中,微生物通常会生存并繁殖以达到增殖或培养微生物的目的。具体地,培养基是通过添加生长所需的所有营养素而制备的液体和固体物质,包含乙酰辅酶A和甘油,但不限于此。

[0104] 此外,本发明的微生物可进一步表达编码将乙酰基转移至双乙酸甘油酯的第二O-乙酰转移酶的基因。

[0105] 在第二O-乙酰转移酶中,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸可以是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(EU);同样,在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE);在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR);在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR);在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸可以是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU);在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸可以是组氨酸(HIS),但不限于此。

[0106] 微生物培养于培养基中,并且不仅可以表达第一O-乙酰转移酶,而且可以表达氯霉素-O-乙酰转移酶或第二O-乙酰转移酶。

[0107] 编码氯霉素-O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:7)的基因(cat,SEQ ID NO:24)可存在于

具有耐氯霉素抗生素标记的载体中，其中载体可以是，例如，pSTV28载体，如果载体是微生物，则可以不加限制地引入载体以从相应的微生物中表达氯霉素-O-乙酰转移酶。例如，载体可以引入大肠杆菌以表达来自大肠杆菌的氯霉素-O-乙酰转移酶，但不限于此。

[0108] 编码第二O-乙酰转移酶的基因可包括，例如：编码氯霉素-O-乙酰转移酶的基因(cat,SEQ ID NO:24)；编码蜡样芽孢杆菌的O-乙酰转移酶的基因(Bc-Oat,SEQ ID NO:25)；编码铜绿假单胞菌的O-乙酰转移酶的基因(Pa-Oat,SEQ ID NO:26)；编码丙酮丁醇梭菌的O-乙酰转移酶的基因(Ca-Oat,SEQ ID NO:27)；并且优选编码蜡样芽孢杆菌的O-乙酰转移酶的基因，但不限于此。

[0109] 此外，第二O-乙酰转移酶的氨基酸序列可与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有32％以上的同源性。

[0110] 此外，本发明的微生物可包括减弱或缺失了的编码乙酰酯酶的基因。

[0111] 乙酸甘油酯作为酯化合物可通过酯结合降解酶(酯酶)降解为甘油和乙酸酯，并且降解乙酸甘油酯的酯酶的实例可以是乙酰酯酶。

[0112] 在其中编码乙酰酯酶的基因被减弱或缺失的微生物的情况下，乙酰酯酶不表达，从而可以增加乙酸甘油酯的生产量。

[0113] 乙酰酯酶可具有不同的序列，这取决于微生物的类型，并且编码其的基因也可具有不同的序列。因此，在相应的微生物中编码乙酰酯酶的基因(aes)可以是减弱的或缺失的。例如，在大肠杆菌的情况下，编码SEQ ID NO:13的乙酰酯酶的SEQ ID NO:30的基因可以是减弱的或缺失的，但不限于此。

[0114] 此外，本文使用的微生物可以是任何微生物，不限于此，只要其表达第一O-乙酰转移酶即可。具体地，微生物可以是任何上述范围内的微生物，但不限于此。

[0115] 此外，当本发明的微生物的主要培养时的初始菌体浓度的范围在OD_{600nm}下为0.05至0.15时，培养基中含有的甘油的浓度范围为3％(v/v)至13％(v/v)。优选地，当初始菌体浓度的范围在OD_{600nm}下为0.08至0.12时，甘油的浓度范围可为5％(v/v)至11％(v/v)，但不限于此。

[0116] 当在具有上述甘油浓度的培养基中以上述菌体浓度培养微生物时，可产生大量的乙酸甘油酯。

[0117] 当甘油浓度大于13％(v/v)时，由于渗透压的过度增加，菌株的增殖和乙酸甘油酯的生产均降低。另一方面，当甘油浓度小于3％(v/v)时，由于底物的低浓度，可降低乙酸甘油酯的生产量。

[0118] 此外，本发明的微生物可进一步表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油3-磷酸酶的基因，并且培养基可以包含葡萄糖，但不限于此。

[0119] 如上所述，微生物表达甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶，其中葡萄糖通过糖酵解途径转化为磷酸甘油酮，然后被酶转化为甘油。

[0120] 编码甘油-3-磷酸脱氢酶的基因(Gpd1)可具有不同的核苷酸序列，这取决于微生物的类型，并且可以是任何基因，只要其可以将相应微生物中作为糖酵解途径的中间代谢物的磷酸甘油酮(DHAP)转化为3-磷酸甘油(G3P)即可。例如，在酿酒酵母的情况下，可以使用编码SEQ ID NO:31的酿酒酵母的甘油-3-磷酸脱氢酶的基因(Sc-gpd1)，但不限于此。

[0121] 编码DL-甘油-3-磷酸酶的基因(Gpp2)可具有不同的核苷酸序列，这取决于微生物

的类型，并且可以是任何基因，只要其可以将相应微生物中作为糖酵解途径的中间代谢物的3-磷酸甘油(G3P)转化为甘油即可。例如，在酿酒酵母的情况下，可以使用编码SEQ ID NO:32的酿酒酵母的DL-甘油-3-磷酸酶的基因(Sc-gpp2)，但不限于此。

[0122] 甘油可以通过上述第一O-乙酰转移酶以及氯霉素-O-乙酰转移酶或第二O-乙酰转移酶转化为乙酸甘油酯复合物。

[0123] 此外，本发明涉及用于生产乙酸甘油酯的组合物，其包括表达编码第一O-乙酰转移酶的基因的微生物。

[0124] 当组合物与甘油接触时，可以通过上述方法在上述范围制备乙酸甘油酯。

[0125] 在第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置70的位置处的氨基酸可以是天冬氨酸(ASP)；同样，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置84的位置处的氨基酸可以是天冬酰胺(ASN)；在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置114的位置处的氨基酸可以是组氨酸(HIS)；在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置126的位置处的氨基酸可以是谷氨酸(GLU)，但不限于此。

[0126] 此外，在第一O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置15的位置处的氨基酸可以是酪氨酸(TYR)或苯丙氨酸(PHE)；同样，在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置26的位置处的氨基酸可以是精氨酸(ARG)或谷氨酰胺(GLN)；在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置30的位置处的氨基酸可以是精氨酸(ARG)或赖氨酸(LYS)；在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置71的位置处的氨基酸可以是酪氨酸(TYR)；在对应于SEQ ID NO:5的氨基酸序列的位置82的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)，但不限于此。

[0127] 此外，第一O-乙酰转移酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有50％以上的同源性。

[0128] 第一O-乙酰转移酶可以是麦芽糖O-乙酰转移酶，更具体地，可以包括大肠杆菌、肉葡萄球菌、咸海洋盐碱球菌、短乳杆菌、枯草芽孢杆菌或恶臭假单胞菌的麦芽糖O-乙酰转移酶，并且优选枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶，但不限于此。

[0129] 编码第一O-乙酰转移酶的基因可以是，例如，编码麦芽糖O-乙酰转移酶的基因，并且编码麦芽糖O-乙酰转移酶的基因可包括，例如，编码大肠杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(maa,SEQ ID NO:16)；编码肉葡萄球菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Sc-maa,SEQ ID NO:17)；编码咸海洋盐碱球菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Hj-maa,SEQ ID NO:18)；编码短乳杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Lb-maa,SEQ ID NO:19)；编码枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Bs-maa,SEQ ID NO:20)；或编码恶臭假单胞菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因(Pp-maa,SEQ ID NO:21)，优选编码枯草芽孢杆菌的麦芽糖O-乙酰转移酶的基因，但不限于此。

[0130] 此外，微生物可进一步表达编码将乙酰基转移至双乙酸甘油酯的第二O-乙酰转移酶的基因。

[0131] 在第二O-乙酰转移酶中，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置31的位置处的氨基酸可以是半胱氨酸(CYS)或亮氨酸(EU)；同样，在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置102的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或异亮氨酸(ILE)；在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置143的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR)；在

对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置166的位置处的氨基酸可以是苯丙氨酸(PHE)或酪氨酸(TYR);在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置170的位置处的氨基酸可以是缬氨酸(VAL)、异亮氨酸(ILE)或亮氨酸(LEU);在对应于SEQ ID NO:7的氨基酸序列的位置193的位置处的氨基酸可以是组氨酸(HIS),但不限于此。

[0132] 编码氯霉素-O-乙酰转移酶的基因可存在于具有耐氯霉素抗生素标记的载体中,例如,载体可以是pSTV28载体,但不限于此。

[0133] 编码第二O-乙酰转移酶的基因可包括,例如,编码蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌或丙酮丁醇梭菌的O-乙酰转移酶的基因,并且优选编码蜡样芽孢杆菌的O-乙酰转移酶的基因,但不限于此。

[0134] 此外,第二O-乙酰转移酶的氨基酸序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列可具有32%以上的同源性。

[0135] 此外,微生物可包括减弱或缺失了的编码乙酰酯酶的基因。

[0136] 酯化合物即乙酸甘油酯可通过酯结合降解酶(酯酶)降解为甘油和乙酸酯,其中降解乙酸甘油酯的酯结合降解酶可以是,例如,乙酰酯酶。

[0137] 在其中编码乙酰酯酶的基因(aes)被减弱或缺失的微生物的情况下,乙酰酯酶不表达,从而增加乙酸甘油酯的生产量。

[0138] 乙酰酯酶可具有不同的序列,这取决于微生物的类型,并且编码其的基因也可具有不同的序列。因此,在微生物中编码乙酰酯酶的基因可以是减弱的或缺失的。例如,在大肠杆菌的情况下,编码SEQ ID NO:13的乙酰酯酶的SEQ ID NO:30的基因可以是减弱的或缺失的,但不限于此。

[0139] 此外,微生物与以上描述的一样,但具体地可以是大肠杆菌,更具体地,可以是DH5α、DH5α(DE3)、AceCo、BW25113、W3110或MG1655,并且优选MG1655,但不限于此。

[0140] 此外,微生物可进一步表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的基因。

[0141] 如上所述,微生物可表达甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶,其中使用上述酶通过糖酵解途径将葡萄糖转化为甘油。

[0142] 编码甘油-3-磷酸脱氢酶的基因(Gpd1)可具有不同的核苷酸序列,这取决于微生物的类型,并且可以是任何脱氢酶,只要其可以将相应微生物中作为糖酵解途径的中间代谢物的磷酸甘油酮(DHAP)转化为3-磷酸甘油(G3P)即可。例如,在酿酒酵母的情况下,可以使用编码SEQ ID NO:31的酿酒酵母的甘油-3-磷酸脱氢酶的基因(Sc-gpd1),但不限于此。

[0143] 编码DL-甘油-3-磷酸酶的基因(Gpp2)可具有不同的核苷酸序列,这取决于微生物的类型,并且可以是任何磷酸酶,只要其可以将相应微生物中作为糖酵解途径的中间代谢物的3-磷酸甘油(G3P)转化为甘油即可。例如,在酿酒酵母的情况下,可以使用编码SEQ ID NO:32的酿酒酵母的DL-甘油-3-磷酸酶的基因(Sc-gpp2),但不限于此。

[0144] 甘油可以通过上述O-乙酰转移酶和氯霉素-O-乙酰转移酶等转化为乙酸甘油酯复合物。

[0145] 在下文中,将详细描述以下实施例以具体说明本发明。在以下实施例中使用的质粒和菌株在表1中总结,PCR的引物在表2中列出。

[0146] [表1]

[0147]

名称	描述	来源
质粒		
pSTV28	P_{lac}表达载体, pACYC184来源, lacZα, Cm^r	Takara Co., Ltd
pTrc99A	P_{trc}表达载体, pBR322来源, $lacI^q$, Amp^r	Amersham Bioscience
pET28a (+)	P_{T7}表达载体, pBR322来源, lacI, 和Kan^r	Novagen
pMD1	含有来自大肠杆菌的lacA的pTrc99A载体	-
pMD2	含有来自大肠杆菌的cysE的pTrc99A载体	-
pMD3	含有来自大肠杆菌的yjgM的pTrc99A载体	-
pMD4	含有来自大肠杆菌的yjaB的pTrc99A载体	-
pMD5	含有来自大肠杆菌的yiiD的pTrc99A载体	-
pMD6	含有来自大肠杆菌的wecH的pTrc99A载体	-
pMD7	含有来自大肠杆菌的nhoA的pTrc99A载体	-
pMD8	含有来自大肠杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMD9	含有来自肉葡萄球菌的maa的pTrc99A载体	-
pMD10	含有来自咸海洋盐碱球菌的maa的pTrc99A载体	-
pMD11	含有来自短乳杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMD12	含有来自恶臭假单胞菌的maa的pTrc99A载体	-
pMD13	含有来自枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMD14	含有来自枯草芽孢杆菌的maa的pET28a载体	-
pT-CAT	含有来自pSTV28的cat的pTrc99A载体	-
pMDT1	含有来自枯草芽孢杆菌的maa的pSTV28载体	-
pMDT2	含有来自pSTV28的cat和枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMDT3	含有来自蜡样芽孢杆菌的oat和枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMDT4	含有来自铜绿假单胞菌的oat和枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMDT5	含有来自丙酮丁醇梭菌的oat和枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A	-

[0148]

	载体	
pMDT6	含有来自脓肿分枝杆菌(M. abscessus)的oat和枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMDT7	含有来自短乳杆菌的oat和枯草芽孢杆菌的maa的pTrc99A载体	-
pMDT8	含有来自酿酒酵母的gpd1和gpp2的pMDT2	-
	菌株	
MG1655	大肠杆菌K-12; $F^-\lambda^-$, $ilvG^-$, rfb-50, rph-1	ATCC700926
DH5α	大肠杆菌K-12; F^-, Φ80lacZ△M15, △(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK^-, mK^+) phoA, supE44, λ^-,thi-1	ATCC98040
BW25113	△(araD-araB)567, △lacZ4787(::rrnB-3), λ^-, rph-1, △(rhaD-rhaB)568, hsdR514	NBRP, NIG
AceCo	MG1655 △ackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, atoDA	参考文献1
W3110	大肠杆菌K-12; F^-, λ^- IN (rrnD-rrnE)1	ATCC27325
DH5α (DE3)	大肠杆菌K-12; F^-, Φ80lacZ△M15, △(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK^-, mK^+) phoA, supE44, λ^-,thi-1, λ(DE3)	-
JW0465	BW25113 △aes	NBRP, NIG
DH-MD0	携带pTrc99A的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD1	携带pMD1的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD2	携带pMD2的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD3	携带pMD3的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD4	携带pMD4的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD5	携带pMD5的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD6	携带pMD6的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD7	携带pMD7的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD8	携带pMD8的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD9	携带pMD9的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD10	携带pMD10的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD11	携带pMD11的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD12	携带pMD12的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD13	携带pMD13的大肠杆菌DH5α	-
DH-MD14	携带pMD14的大肠杆菌DH5α(DE3)	-
DH-MDT1	携带pMDT1的大肠杆菌DH5α	-
DH-EMPT	携带pTrc99A的大肠杆菌DH5α	-
DH-CAT	携带pT-CAT的大肠杆菌DH5α	-
DH-MDT2	携带pMDT2的大肠杆菌DH5α	-
DH-MDT3	携带pMDT3的大肠杆菌DH5α	-
DH-MDT4	携带pMDT4的大肠杆菌DH5α	-
DH-MDT5	携带pMDT5的大肠杆菌DH5α	-
DH-MDT6	携带pMDT6的大肠杆菌DH5α	-
DH-MDT7	携带pMDT7的大肠杆菌DH5α	-
AC-MDT2	携带pMDT2的大肠杆菌AceCo	-
BW-MDT2	携带pMDT2的大肠杆菌BW25113	-
W3-MDT2	携带pMDT2的大肠杆菌W3110	-

[0149]

MG-MDT2	携带pMDT2的大肠杆菌MG1655	-
BW-Empty	携带pTrc99A的大肠杆菌BW25113	-
BW-Aes	携带pT-Aes的大肠杆菌BW25113	-
BW-MDT2 (*Daes*)	携带pMDT2的大肠杆菌JW0465	-
DH-MDT8	携带pMDT8的大肠杆菌DH5α	-

[0150] 参考文献1.Kim,J.-H.等人Isoprene production by Escherichia coli through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts.Microbial Cell Factories 15,214(2016)。

[0151] [表2]

[0152]

引物 [a, b, c]	描述(5'-> 3')	序列号
Ec-lacA-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGGAACATGCCAATGACCG	33
Ec-lacA-R	GTTTCTAGATTAAACTGACGATTCAACTTTATAATC	34
Ec-cysE-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGTCGTGTGAAGAACTGGAAATTG	35
Ec-cysE-R	GTTTCTAGATTAGATCCCATCCCCATACTC	36
Ec-yjgm-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAATAACATTGCGCCGC	37
Ec-yjgM-R	GTTTCTAGATTAGAGTTCGCGCAACATCC	38
Ec-yjaB-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGGTTATTAGTATTCGCCGCTC	39
Ec-yjaB-R	GTTTCTAGATTACGCCCCCACATACGC	40
Ec-yiiD-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAGCCAGCTTCCAGGG	41
Ec-nhoA-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGACGCCCATTCTGAATCAC	42
Ec-nhoA-R	GTTTCTAGATTATTTTCCCGCCTCCGGG	43
Ec-wecH-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGCAGCCCAAAATTTACTGG	44
Ec-WecH-R	GTTTCTAGATTAACTCACTAATCTGTTTCTGTCG	45
Ec-yiiD-R	GTTTCTAGATTACTCTTCTTCGTTCCCGC	46
Ec-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAGCACAGAAAAAGAAAAGATG	47
Ec-maa-R	GTTTCTAGATTACAATTTTTTAATTATTCTGGCTG	48
Sc-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGACCACCGAGAAGGAAAAAATG	49
Sc-maa-R	GTTTCTAGATTAATCCAGCGGCACTTCAC	50
Hj-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGACCAGCGAGAAGGAACG	51
Hj-maa-R	GTTTCTAGATTAATCAACGTCCTTCAGCACA	52
Lb-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGGACAAGAGCGAGAAGG	53
Lb-maa-R	GTTTCTAGATTATTTCAGCGGCTTAATCAC	54
Pp-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAGCCTGAGCGAG	55

[0153]

	AAGCAC	
Pp-maa-R	GTTTCTAGATTATTGACCCTGATCCGGCTG	56
Bs-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGCTGCGTACCGAG AAGG	57
Bs-maa-R	GTTTCTAGATTACAGTTGTTTCAGAATACGCGC	58
Cat-F	CTAGGAGCTC*AGGAGAAATATA*ATGGAGAAAAAAAT CACTGGATATAC	60
Cat-R	CTGGATCCTTACGCCCCGCCCTGCC	61
Trc-Bs.maa-F	**AGATCT**GAGTCGACAGTATCGGCGGG	62
Trc-Bs.maa-R	**TATATTTCTCCT**GAGGATCCCCGGGTACCG	63
Bc-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATG GACTTCCACCAGATC	64
Bc-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTACAGCCATTC CTCAAAG	65
Ca-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATG AACAGCAACTTCCAC	66
Ca-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTAACGAATCC ACTCTTTC	67
Lb-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATG ACCGAGCTGAACACCC	68
Lb-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTACGCGGTCA GCCACAG	69
Ma-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATG CCGGCGGAGCACGCG	70
Ma-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTAATCACGAA CCCAATCCGGGTCCG	71
Pa-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATG AGCTACACCCGTGTTG	72
Pa-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTAGCCACCCG CTTCATC	73
Ec-aes-F	CTGGATCC*GTCACCCAACCCTTT*ATGAAGCCGGAAA ACAAACTACC	74
Ec-aes-R	TATCGTCGACTTAAAGCTGAGCGGTAAAGAACTG	75
Sc-gpd1-F	GCGGATCC*AGGAGGTAATAAAA*TGTCTGCTGCTGCT GATAGATTAAAC	76
Sc-gpd1-R	AATGCTGCAGTTAATCTTCATGTAGATCTAATTCTTC AATC	59
Sc-gpp2-F	TGCTGCAG*AGGAGGTAATTTAT*ATGGGATTGACTACT AAACCTCTATC	22
Sc-gpp2-R	CCCAAGCTTACCATTTCAACAGATCGTCC	23

[0154] [a]限制酶位点用下划线标出。[b]RBS序列用斜体标出。[c]重叠序列用粗体标出。

[0155] 实施例

[0156] 1.使用大肠杆菌来源的O-乙酰转移酶的单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的生产

[0157] 为了生产单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯,选择大肠杆菌中能够将乙酰基转移至甘油的八(8)个O-乙酰转移酶候选基因,并将各基因克隆至pTrc99A表达载体(SEQ ID NO:78)以构建pMD1至pMD8。使用大肠杆菌MG1655的染色体作为模板通过PCR扩增下述来获得候选基因:半乳糖苷O-乙酰转移酶;麦芽糖O-乙酰转移酶(SEQ ID NO:1);丝氨酸乙酰转移酶;O-

乙酰转移酶WecH;和lacA(SEQ ID NO:80)、maa(SEQ ID NO:16)、cysE(SEQ ID NO:81)、wecH(SEQ ID NO:82)、和nhoA(SEQ ID NO:83),分别编码芳基胺N-乙酰基转移酶;和三(3)个O-乙酰转移酶假定基因诸如yjgm(SEQ ID NO:84)、yjaB(SEQ ID NO:85)和yiiD(SEQ ID NO:86)。在这种情况下,本文所用的PCR引物是Ec-lacA-F(SEQ ID NO:33)/Ec-lacA-R(SEQ ID NO:34)、Ec-maa-F(SEQ ID NO:47)/Ec-maa-R(SEQ ID NO:48)、Ec-cysE-F(SEQ ID NO:35)/Ec-cysE-R(SEQ ID NO:36)、Ec-wecH-F(SEQ ID NO:44)/Ec-wecH-R(SEQ ID NO:45)、Ec-nhoA-F(SEQ ID NO:42)/Ec-nhoA-R(SEQ ID NO:43)、Ec-yjgm-F(SEQ ID NO:37)/Ec-yjgM-R(SEQ ID NO:38)、Ec-yjaB-F(SEQ ID NO:39)/Ec-yjaB-R(SEQ ID NO:40)、和Ec-yiiD-F(SEQ ID NO:41)/Ec-yiiD-R(SEQ ID NO:46)。使用BamHI和XbaI将PCR反应产物克隆至pTrc99A载体。使用以这种方式构建的质粒pDM1至pDM8,转化大肠杆菌DH5α,从而形成重组菌株DH-MD1至DH-MD8,并使用其以分析单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的生产(图3)。

[0158] 使用LB复合培养基(每升含10g胰蛋白胨、5g酵母提取物和10g氯化钠)在37℃下振荡培养约12小时来进行种子培养。通过向M9基本培养基(含$Na_2HPO_4 \cdot 7H_20$,12.8g/L;KH_2PO_4,3g/L;NaCl,0.5g/L;NH_4Cl,1g/L;$MgSO_4$,1mM $CaCl_2$,100mM)添加5g/L的酵母提取物和2%(v/v)甘油进行主要培养。然后,将混合物在37℃和250rpm的振荡速度下孵育48小时。根据引入重组菌株的质粒的抗生素标记,添加100mg/L氨苄青霉素、50mg/L氯霉素或50mg/L卡那霉素抗生素。培养溶液的初始菌体浓度在OD_{600nm}下为0.1,并且为表达引入质粒中的基因,在培养开始时添加0.5mM异丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)。

[0159] 通过配备有HP-INNOVAX色谱柱(19091N-133,长度30m,内径0.250mm和膜厚0.25μm)和GC-MS(GC-MS-QP2010,SHIMADZU,Japan)的GC(Agilent Technologies 7890A,USA)进行乙酸甘油酯化合物的分析。乙酸甘油酯标准化合物购自Sigma(USA)。此外,使用乙酸乙酯溶剂从培养基中提取主要培养物中生产的乙酸甘油酯复合物,并且将1μL的提取的样品注入GC或GC-MS。GC的柱箱温度从50℃开始,以20℃/min的速率达到90℃,然后以15℃/min的速率将温度连续升高至150℃,以20℃/min的速率升至190℃,然后以15℃/min的速率升至230℃。此后,将最终温度保持2分钟。此外,火焰离子检测器(FID)的温度保持在280℃。根据上述分析程序的分析结果示于图5。

[0160] 根据图3所示的重组菌株DH-MD1至DH-MD8的培养结果,单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯仅在用pMD8质粒转化的DH-MD8菌株中产生。这说明,仅八(8)个大肠杆菌来源的O-乙酰转移酶候选物中的麦芽糖O-乙酰基转移酶基因(maa)具有将乙酰基转移至甘油的能力。

[0161] 2.使用大肠杆菌Maa样酶的单乙酸甘油酯的生产

[0162] 为了发现O-乙酰转移酶较在大肠杆菌中发现的Maa具有较高的活力,对大肠杆菌Maa的氨基酸序列进行BLAST搜索。然后,在微生物诸如肉葡萄球菌、咸海洋盐碱球菌、短乳杆菌、枯草芽孢杆菌、和恶臭假单胞菌之中,获得额外的五(5)种麦芽糖O-乙酰转移酶,即Sc-mOat(SEQ ID NO:2)、Hj-mOat(SEQ ID NO:3)、Lb-mOat(SEQ ID NO:4)、Bs-mOat(SEQ ID NO:5)和Pp-mOat(SEQ ID NO:6),然后将其在大肠杆菌中表达。之后,比较单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的生产率(图3)。

[0163] 微生物为了优化基因在宿主大肠杆菌中的表达,根据GenScript(USA)中大肠杆菌密码子的使用合成微生物来源的基因。使用以下PCR引物合成的基因进行扩增:Sc-maa-F(SEQ ID NO:49)/Sc-maa-R(SEQ ID NO:50)、Hj-maa-F(SEQ ID NO:51)/Hj-maa-R(SEQ ID

NO:52)、Lb-maa-F(SEQ ID NO:53)/Lb-maa-R(SEQ ID NO:54)、Pp-maa-F(SEQ ID NO:55)/Pp-maa-R(SEQ ID NO:56)、Bs-maa-F(SEQ ID NO:57)/Bs-maa-R(SEQ ID NO:58),以获得Sc-maa(SEQ ID NO:17)、Hj-maa(SEQ ID NO:18)、Lb-maa(SEQ ID NO:19)、Pp-maa(SEQ ID NO:21)和Bs-maa(SEQ ID NO:20)基因,然后使用BamHI和XbaI将其克隆至pTrc99A载体中。使用以这种方式构建的质粒pMD9至pMD13,转化大肠杆菌DH5α,从而形成重组菌株DH-MD9至DH-MD13,并使用其比较单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的生产率(图3)。

[0164] 作为比较的结果,确认枯草芽孢杆菌的Maa(Bs-maa)显示最高的单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯生产率。培养方法和分析方法与实施例1相同。

[0165] 3.使用氯霉素-O-乙酰转移酶的三乙酸甘油酯的生产

[0166] 为了最佳表达显示最高的单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯生产率的枯草芽孢杆菌的Maa基因(Bs-maa),将基因克隆至各种载体诸如pTrc99A(SEQ ID NO:78)、pET28a(SEQ ID NO:79)和pSTV28(SEQ ID NO:77)等,以构建pMD13、pMD14和pMDT1质粒,然后形成用上述质粒转化的重组大肠杆菌DH-MD13、DH-MD14、和DH-MDT1。在这方面,大肠杆菌DH5α(DE3)用作具有T7启动子的pMD14的转化宿主菌株。使用Novagen(USA)的λDE3溶原试剂盒,由大肠杆菌DH5α制备DH5α(DE3)菌株。在DH-MDT1菌株中,单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯生产率最高,以及还观察到三乙酸甘油酯生产(图4)。

[0167] 据推测这是由于pSTV28载体的抗生素标记氯霉素-O-乙酰转移酶(CAT,SEQ ID NO:7)引起的。已知CAT由于其广泛的底物特异性而将乙酰基转移至各种底物。将pMDT2质粒在pMD13质粒的Bs-maa基因之前引入和构建,以增强通过额外的乙酰基向单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯的转移而生产三乙酸甘油酯的CAT酶基因(cat,SEQ ID NO:24)的表达(图6)。

[0168] 为此,使用PCR引物Cat-F(SEQ ID NO:60)/Cat-R(SEQ ID NO:61)从pSTV28中PCR扩增cat基因,用SacI和BamHI切割,并且引入相应的pMD13的限制性内切酶位点。关于DH-MDT2重组菌株转化为pMDT2,单乙酸甘油酯、双乙酸甘油酯和三乙酸甘油酯复合物的生产量,以及三乙酸甘油酯的比例与DH-MDT1菌株相比,显著增加。培养方法和分析方法与实施例1相同。

[0169] 4.使用CAT样酶的三乙酸甘油酯化合物的生产

[0170] 为了进一步发现将单乙酸甘油酯和双乙酸甘油酯转化为三乙酸甘油酯的酶,使用CAT酶的氨基酸序列进行BLAST搜索。通过该搜索,具有高同源性的五(5)种O-乙酰转移酶,即OAT、Bc-OAT(SEQ ID NO:8)、Pa-OAT(SEQ ID NO:9)、Ca-OAT(SEQ ID NO:10)、Ma-OAT(SEQ ID NO:11)和Lb-OAT(SEQ ID NO:12)源自蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、丙酮丁醇梭菌、脓肿分枝杆菌(Mycobacterium abscessus)和短乳杆菌。此外,这些酶由GenScript公司(USA)使用大肠杆菌来合成,以优化其在宿主大肠杆菌中的表达。

[0171] 合成的基因源自微生物,即,使用PCR引物Bc.Oat-F(SEQ ID NO:64)/Bc.Oat-R(SEQ ID NO:65)、Pa.Oat-F(SEQ ID NO:72)/Pa.Oat-R(SEQ ID NO:73)、Ca.Oat-F(SEQ ID NO:66)/Ca.Oat-R(SEQ ID NO:67)、Ma.Oat-F(SEQ ID NO:70)/Ma.Oat-R(SEQ ID NO:71)、和Lb.Oat-F(SEQ ID NO:68)/Lb.Oat-R(SEQ ID NO:69)扩增Bc-Oat(SEQ ID NO:25)、Pa-Oat(SEQ ID NO:26)、Ca-Oat(SEQ ID NO:27)、Ma-Oat(SEQ ID NO:28)和Lb-Oat(SEQ ID NO:29)。

[0172] 通过HiFi DNA组装将以此方式扩增的各基因的片段连接至基于pMD13的质粒骨

架,从而构建质粒pMDT3至pMDT7(图7)。

[0173] 通过NEB公司(USA)的HiFi DNA组装试剂盒进行HiFi DNA组装,并且使用PCR引物如Trc-Bs.maa-F(SEQ ID NO:62)和Trc-Bs.maa-R(SEQ ID NO:63)使用pMD13作为模板通过PCR扩增获得基于pMD13的质粒骨架。将用pMDT3至pMDT7质粒转化的重组菌株DH-MDT2至DH-MDT7的乙酸甘油酯复合物的生产量一起比较(图7)。

[0174] 结果,取决于OAT基因的类型,乙酸甘油酯复合物的生产量存在显著差异。此外,源自短乳杆菌和脓肿分枝杆菌的O-乙酰转移酶没有能力生产三乙酸甘油酯,而源自蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌和丙酮丁醇梭菌的O-乙酰转移酶生产三乙酸甘油酯,但是与作为pSTV28的抗生素标记的CAT生产的三乙酸甘油酯相比具有较低的生产率。培养方法和分析方法与实施例1相同。

[0175] 5.根据大肠杆菌种类的量和甘油的添加量的乙酸甘油酯复合物的生产量的变化

[0176] 大肠杆菌DH5α用作先前实施例的宿主。为了比较取决于大肠杆菌类型的乙酸甘油酯化合物的生产率,本实施例培养重组大肠杆菌DH-MDT2、AC-MDT2、BW-MDT2、W3-MDT2和MG-MDT2,所述重组大肠杆菌是使用质粒pMDT2转化作为宿主的大肠杆菌AceCo、BW25113、W3110、和MG1655而得到的,然后比较乙酸甘油酯复合物的生产率(图8A和8B)。

[0177] 由于重组菌株MG-MDT2中乙酸甘油酯复合物的生产率最高,因此证实大肠杆菌MG1655是最适合乙酸甘油酯化合物生产的宿主。培养方法和分析方法与实施例1相同。

[0178] 为了根据在显示乙酸甘油酯化合物的最高生产率的重组菌株MG-MDT2中作为底物添加的甘油的量检查乙酸甘油酯化合物的生产率,除了添加的甘油的浓度在2至15%(v/v)之间变化外,此处所用的所有培养条件和分析方法与实施例1相同(图8C和8D)。

[0179] 随着作为起始底物的甘油的量的增加,乙酸甘油酯复合物的生产量也随之增加。然而,在添加15%以上的甘油的情况下,由于过大的渗透压的作用,作为结果,菌株增殖和乙酸甘油酯生产量均降低。

[0180] 6.通过去除降解乙酸甘油酯化合物的酶基因的生产率的提高

[0181] 由于酯化合物,即乙酸甘油酯可以通过酯结合降解酶(酯酶,SEQ ID NO:13)降解成甘油和乙酸酯,考虑了大肠杆菌的乙酰酯酶基因(aes,SEQ ID NO:30)的扩增或缺失作用(图9)。

[0182] 使用Ec-aes-F(SEQ ID NO:74)和Ec-aes-R(SEQ ID NO:75)作为引物和大肠杆菌MG1655的染色体作为模板,通过PCR扩增获得Aes基因片段,然后,将所述基因片段克隆至具有BamHI和SalI限制性内切酶的pTrc99A,从而构建质粒pTAes。为了观察Aes酶对三乙酸甘油酯的降解,制备分别用空载体pTrc99A和质粒pTAes从大肠杆菌BW25113中转化得到的重组菌株EW-空和BW-Aes,随后在含有加入其中的15g/L的三乙酸甘油酯标准化合物的培养基中培养上述重组菌株。培养条件与上述实施例中使用的乙酸甘油酯复合物的生产条件相同(图9A和9B)。

[0183] 虽然在BW-空和BW-Aes菌株中都发生了三乙酸甘油酯标准化合物的降解,但在过表达aes基因的BW-Aes中,降解程度被证实要高得多。通过三乙酸甘油酯的降解,在培养基中测定了少量的双乙酸甘油酯,但未检测到单乙酸甘油酯。据推测,这是因为单乙酸甘油酯的降解发生得更快。

[0184] 基于上述aes降解乙酸甘油酯化合物的结果,用pMDT2转化aes基因缺失的JW0465

菌株和野生型菌株BW25113,以分别制备重组菌株BW-MDT2和BW-MDT2(Daes),然后比较上述重组菌株中乙酸甘油酯复合物的生产和菌株增殖(图9C和9D)。

[0185] JW0465菌株是从BW25113菌株中缺失aes基因的菌株,由NBRP(NIG,Japan)出售。菌株培养于2YT复合培养基中(每升含16g胰蛋白胨、10g酵母提取物、和5g氯化钠),向其中加入10%(v/v)甘油作为底物。其他培养和分析条件与上述实施例相同。

[0186] 确认在aes基因缺失的BW-MDT2(Daes)菌株中,乙酸甘油酯的降解被抑制,因此乙酸甘油酯复合物的生产量约为BW-MDT2菌株的乙酸甘油酯复合物的生产量的2倍高。另一方面,两个重组菌株之间的菌株增殖没有差异。从这些结果可以看出,aes参与乙酸甘油酯化合物的降解,并且当缺失aes基因时,可以提高乙酸甘油酯复合物的生产率。

[0187] 7.使用葡萄糖作为底物的乙酸甘油酯化合物的生产

[0188] 如图2所示,磷酸甘油酮(DHAP)是糖酵解途径(Embden-Meyerhof途径)的中间代谢物,可以通过甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶经由3-磷酸甘油转化为甘油。因此,还可以通过额外的甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶的过表达来生产基于葡萄糖作为起始底物的乙酸甘油酯复合物。本文使用的甘油-3-磷酸脱氢酶和DL-甘油-3-磷酸酶是分别源自酿酒酵母的Gpd1(SEQ ID NO:14)和Gpp2(SEQ ID NO:15)。

[0189] 图10:(A)是质粒pMDT8的结构图,其通过以下产生:将甘油生产基因即源自酿酒酵母的Sc-gpd1(SEQ ID NO:31)和Sc-gpp2(SEQ ID NO:32)克隆至pMDT2质粒,从而由葡萄糖生产乙酸甘油酯复合物。(B)、(C)和(D)显示与对照,即DH-MDT2相比,用上述质粒转化的重组大肠杆菌DH-MDT8由葡萄糖生产乙酸甘油酯复合物、其菌株增殖、和培养基的pH变化。

[0190] 使用Sc-gpd1-F(SEQ ID NO:76)和Sc-gpd1-R(SEQ ID NO:59)作为引物和酿酒酵母的染色体作为模板对Sc-gpd1进行PCR扩增,而使用Sc-gpp2-F(SEQ ID NO:22)和Sc-gpp2-R(SEQ ID NO:23)作为引物对Sc-gpp2进行PCR扩增。然后,将前者用BamHI和PstI限制性内切酶切割,将后者用PstI和HindIII限制性内切酶切割,然后将处理产物各自引入pMDT2质粒的相应限制性酶位点,从而构建质粒pMD8。通过将重组菌株DH-MDT2和DH-MDT8接种在代替甘油添加有1%(w/v)的葡萄糖的2YT复合培养基中进行48小时的培养。其他培养和分析条件与上述实施例相同。

[0191] 在上述两个重组菌株中,仅在DH-MDT8菌株中表达基因Sc-gpd1和Sc-gpp2,在菌株增殖和培养基的pH相似的情况下生产乙酸甘油酯复合物。

<110> 庆尚国立大学校产学协力团
庆北大学校产学协力团
<120> 用于生物生产乙酸甘油酯化合物的方法
<130> 18P01058
<150> KR 10-2018-0129090
<151> 2018-10-26
<160> 86
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 183
<212> PRT
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 1

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

<210> 2

<211> 185
<212> PRT
<213> 肉葡萄球菌(Staphylococcus carnosus)
<400> 2

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

<210> 3
<211> 184
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 咸海洋盐碱球菌(Halalkalicoccus jeotgali)
<400> 3

Met Thr Ser Glu Lys Glu Arg Met Leu Arg Gly Glu Pro Tyr Asp Ala
1 5 10 15
Ser Asp Ser Glu Leu Val Ala Glu Arg Gln His Ala Arg Glu Leu Thr
20 25 30

Arg Lys Tyr Asn Arg Thr Thr Ala Thr Glu Ser Asp Arg Arg Glu Arg
35 40 45
Leu Leu Glu Glu Leu Phe Gly Ser Val Glu Asp Ala Thr Val Glu Pro
50 55 60
Pro Ile Arg Cys Asp Tyr Gly Tyr Asn Val His Val Gly Glu Asn Phe
65 70 75 80
Tyr Ala Asn Phe Asp Cys Val Ile Leu Asp Val Arg Arg Val Glu Phe
85 90 95
Gly Thr Arg Cys Leu Leu Gly Pro Gly Val His Val Tyr Thr Ala Thr
100 105 110
His Pro Leu Asp Ala Glu Glu Arg Ala Ala Gly Leu Glu Ser Gly Ala
115 120 125
Pro Val Thr Val Gly Asp Asp Val Trp Ile Gly Gly Arg Ala Val Leu
130 135 140
Asn Ser Gly Val Ser Val Gly Asp Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ala
145 150 155 160
Val Val Thr Glu Asp Val Pro Ala Gly Ala Leu Val Gly Gly Asn Pro
165 170 175
Ala Arg Val Leu Lys Asp Val Asp
180

<210> 4
<211> 187
<212> PRT
<213> 短乳杆菌(Lactobacillus brevis)
<400> 4
Met Asp Lys Ser Glu Lys Glu Lys Met Ile Thr Gly Glu Leu Phe Asn
1 5 10 15
Val Tyr Asp Pro Glu Leu Val Ala Glu Arg Gly Ala Ala Arg Gln Gln
20 25 30
Val Glu Ala Leu Asn Glu Leu Gly Glu Gln Asp Pro Glu Lys Ser Gln
35 40 45
Gln Leu Val Lys Arg Leu Phe Gly Ala Thr Gly Asp Gln Val Glu Val
50 55 60
His Ala Thr Phe Arg Cys Asp Tyr Gly Tyr Asn Ile Tyr Val Gly Glu
65 70 75 80
Asn Phe Phe Ala Asn Tyr Asp Cys Thr Ile Leu Asp Val Ala Pro Ile
85 90 95
Arg Ile Gly Lys His Cys Leu Leu Gly Pro Lys Val Gln Ile Tyr Ser
100 105 110

Val Asn His Pro Ala Glu Pro Glu Leu Arg Arg Asn Gly Ala Met Gly
115 120 125
Ile Gly Lys Pro Val Thr Leu Gly Asp Asp Val Trp Val Gly Gly Gly
130 135 140
Ala Ile Ile Cys Pro Gly Val Thr Leu Gly Asp Asn Val Ile Val Ala
145 150 155 160
Ala Gly Ala Val Val Thr Lys Ser Phe Gly Ser Asn Val Val Leu Gly
165 170 175
Gly Asn Pro Ala Arg Val Ile Lys Pro Leu Lys
180 185

<210> 5
<211> 184
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)
<400> 5

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

<210> 6
<211> 188
<212> PRT
<213> 恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)
<400> 6

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

<210> 7
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> pSTV28载体
<400> 7

```
Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1               5                  10                  15
His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
```

20 25 30

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

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Phe Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp
100 105 110

Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
115 120 125

Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140

Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160

Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175

Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His
180 185 190

His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Met Leu Asn Glu Leu
195 200 205

Gln Gln Tyr Cys Asp Glu Trp Gln Gly Gly Ala
210 215

<210> 8

<211> 215

<212> PRT

<213> 蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)

<400> 8

Met Asp Phe His Gln Ile Asp Ile Asp Arg Trp Asn Arg Lys Pro Tyr
1 5 10 15

Phe Glu His Tyr Ile Lys Glu Gly Lys Cys Ser Tyr Ser Val Thr Ala
20 25 30

Asn Leu Asn Val Thr Ala Leu Leu Asn Gly Leu Arg Lys Lys Asn Met
35 40 45

Lys Leu Tyr Pro Ala Phe Ile Tyr Met Ile Ser Arg Val Val Asn Ser
50 55 60

His Ile Glu Phe Arg Thr Ala Phe Asn Asp Lys Gly Gln Leu Gly Tyr

65 70 75 80
Trp Glu Gln Met Val Pro Thr Tyr Thr Ile Phe His Lys Glu Asp Lys
85 90 95
Thr Phe Ser Ala Met Trp Thr Glu Tyr Ser Ser Asp Phe Ser Leu Phe
100 105 110
Tyr Lys Asn Tyr Leu Gln Asp Ile Asp Arg Tyr Gly Asp Lys Lys Gly
115 120 125
Leu Trp Val Lys Glu Asn Val Pro Ala His Thr Phe Ser Ile Ser Ala
130 135 140
Leu Pro Trp Val Ser Phe Thr Gly Phe Gln Leu Asn Leu Tyr Asn Gly
145 150 155 160
Glu Tyr Leu Leu Pro Ile Ile Thr Leu Gly Lys Tyr Phe Ser Asp Gly
165 170 175
Glu Thr Val Cys Leu Pro Ile Ser Leu Gln Val His His Ala Val Cys
180 185 190
Asp Gly Tyr His Val Ser Met Phe Ile Asn Glu Leu Gln Lys Leu Ala
195 200 205
Asp Ser Phe Glu Glu Trp Leu
210 215

<210> 9
<211> 212
<212> PRT
<213> 铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)
<400> 9

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

115 120 125
Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Val Phe Tyr Val Ser Ala Asn Pro
130 135 140
Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Phe Asn Phe Ala Ser Ala Asn Asn
145 150 155 160
Phe Phe Ala Pro Leu Phe Thr Val Gly Lys Tyr Tyr Ser Gln Ala Gly
165 170 175
Lys Thr Leu Val Pro Leu Ala Val Gln Val His His Ala Val Cys Asp
180 185 190
Gly Phe His Ala Ala Arg Leu Val Thr Glu Leu Gln Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Glu Ala Gly Gly
210

<210> 10
<211> 220
<212> PRT
<213> 丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylicum)
<400> 10
Met Asn Ser Asn Phe His Ala Ile Asp Met Asn Thr Tyr Pro Arg Ala
1 5 10 15
His Thr Tyr Asn Tyr Phe Thr Lys Thr Val Ser Thr Leu Ile Tyr Ser
20 25 30
Ile Asn Ile Thr Leu Asp Val Thr Ile Leu Arg Ala Thr Leu Lys Asn
35 40 45
Lys Gly Leu Lys Phe Phe Pro Ala Tyr Val Tyr Leu Val Thr Arg Ala
50 55 60
Ile Gly Arg His Gln Glu Phe Leu Met Ala Ile Gln Asn Asp Met Leu
65 70 75 80
Gly Tyr Trp Asp Cys Arg Thr Pro Phe Tyr Pro Ile Phe His Glu Asp
85 90 95
Asp Lys Thr Ile Thr Phe Leu Trp Thr Glu Tyr Asn Glu Asp Phe Glu
100 105 110
Val Phe Tyr Lys Asn Tyr Ile Ser Asp Ile Arg Glu Tyr Gly Asn Asn
115 120 125
His Gly Ile Met Leu Ser Lys Asp Ala Pro Pro Ser Asn Asn Tyr Ile
130 135 140
Ile Ser Cys Ile Pro Trp Phe Ser Phe Asn Ser Leu Ser Met Gln Leu
145 150 155 160
Gln Asn Ala Lys Asn Tyr Tyr Ala Pro Ile Phe Glu Ala Gly Arg Phe

165 170 175
Thr Glu Thr Asn Gly Ile Ile Thr Leu Pro Leu Ser Ile Thr Val Asn
180 185 190
His Ala Thr Val Asp Gly Tyr His Ile Lys Leu Leu Leu Asp Glu Leu
195 200 205
Gln Trp Ser Met Ser His Pro Lys Glu Trp Ile Arg
210 215 220

<210> 11
<211> 229
<212> PRT
<213> 脓肿分枝杆菌(Mycobacterium abscessus)
<400> 11

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

210 215 220

Asp Trp Val Arg Asp
225

<210> 12
<211> 222
<212> PRT
<213> 短乳杆菌(Lactobacillus brevis)
<400> 12

Met Thr Glu Leu Asn Thr His Ala Thr Pro Ile Asp Gln Thr Thr Trp
1 5 10 15
Ala Arg Arg Glu Tyr Phe Tyr Tyr Phe Thr Lys Met Met Pro Thr Gly
20 25 30
Phe Thr Leu Asn Val Asp Met Asp Ile Thr Ala Thr Lys Ala Trp Leu
35 40 45
Thr Lys His Asp Arg Lys Phe Asn Pro Ala Tyr Leu Tyr Leu Val Thr
50 55 60
Lys Leu Ile Thr Lys His Pro Glu Phe Arg Val Gly Gln Val Asp Gly
65 70 75 80
Gln Leu Val Glu Tyr Asp Val Leu His Pro Ser Tyr Ser Thr Phe His
85 90 95
Gly Asp Asp Leu Thr Ile Ser Asn Leu Trp Thr Ala Tyr Asp Pro Ser
100 105 110
Phe Glu Gln Phe His Gln Asn Tyr Leu Ala Asp Gln Ala Thr Tyr Gly
115 120 125
Asp Gln His Thr Pro Met Pro Lys Ala Pro Gln Gly Ala Asn Thr Tyr
130 135 140
Met Ile Gly Ser Ile Pro Trp Thr His Phe Asn Ser Tyr Thr Pro Leu
145 150 155 160
Pro Phe Thr Pro Leu Asn Thr Phe Phe Pro Val Ile Gln Ala Gly Arg
165 170 175
Phe Thr Phe Lys Asp Gly Gln Trp Leu Met Pro Leu Ser Phe Thr Ile
180 185 190
His His Ala Val Ala Asp Gly Tyr His Val Ser Gln Phe Phe Asn Glu
195 200 205
Leu Gln Arg Val Phe Asp His Pro Glu Leu Trp Leu Thr Ala
210 215 220

<210> 13
<211> 319
<212> PRT

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<400> 13

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

290 295 300

Asp Glu Ala Leu Arg Asp Gly Ala Gln Phe Phe Thr Ala Gln Leu

305 310 315

<210> 14

<211> 391

<212> PRT

<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<400> 14

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn

1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu

20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr

35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe

50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu

65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu

85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile

100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln

115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His

130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly

145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys

165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His

180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly

195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg

210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile

225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu

245 250 255
Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270
Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285
Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300
Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320
Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335
Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350
Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365
Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380
Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 15
<211> 250
<212> PRT
<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)
<400> 15
Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
1 5 10 15
Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
20 25 30
Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
35 40 45
Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
50 55 60
Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
85 90 95
Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
100 105 110
Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His

115 120 125
Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys
130 135 140
Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu
145 150 155 160
Gly Tyr Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Lys Val Val Val
165 170 175
Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly Lys Ala Ala Gly Cys
180 185 190
Lys Ile Ile Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu Asp Phe Leu Lys Glu
195 200 205
Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu Ser Ile Arg Val Gly
210 215 220
Gly Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
225 230 235 240
Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
245 250

<210> 16
<211> 552
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 16
atgagcacag aaaaagaaaa gatgattgct ggtgagttgt atcgctcggc agatgagacg 60
ttatctcgcg atcgcctgcg cgctcgtcag cttattcacc gatacaatca ttccctggcg 120
gaagagcaca cattacgcca gcaaattctc gctgatctat tcggtcaggt gacagaggct 180
tatattgagc caacgtttcg ctgtgactat ggctataaca tttttctcgg taataatttt 240
ttcgccaact tcgattgcgt gatgcttgat gtctgcccta ttcgcatcgg tgataactgt 300
atgttggcac caggcgttca tatctacacg gcaacacatc ccatcgaccc tgtagcacgt 360
aatagcggtg ctgaactggg gaaacccgtc accatcggta ataacgtctg gattggcgga 420
cgcgcggtca ttaaccctgg tgtgaccatt ggtgataacg tcgtggtagc ctcaggtgca 480
gttgtcacaa aagatgtccc ggacaacgtt gtcgtgggcg gtaatccagc cagaataatt 540
aaaaaattgt aa 552
<210> 17
<211> 547
<212> DNA
<213> 肉葡萄球菌(Staphylococcus carnosus)
<400> 17
atgaccaccg agaaggaaaa aatgctgagc ggtcagctgt acaacagccg tgacccgcaa 60
ctggttaagg agcgtcacaa agcgcgtcac gcgaccaagg cgatcaacaa cgcgttcagc 120

attaaaacgt cactttctgc tgcgtcagag catcggtcac tgcggcgaca acgtgttcat 180
cgagccggaa ttcacttcga ttacggttac aacattagcc tgggcaacca cttctatgcg 240
aactttaacc cgttagctgg atgtggcgcc gatcaccatt ggtaaccacg ttctgctggg 300
cccgaacgtg caactgatcc cgcgacccac ccgctgaacc cggcggagcg tgcgagcggt 360
ctggaactgg cgttcccgat catattggcg accacgtttg gattggtgcg ggtgcgattg 420
ttctgccggg tgtgaccatt gcgataactg gttgtgggtg cgggcagcgt tgtgaccaag 480
gacatcccgg ataaccaggt tgtgcgggca accggcgcgt tttattcgtg aagtgccgct 540
ggattaa 547

<210> 18
<211> 554
<212> DNA
<213> 未知
<220>
<223> 咸海洋盐碱球菌(Halalkalicoccus jeotgali)
<400> 18
atgaccagcg agaaggaacg tatgctgcgt ggtgagccgt acgacgcgag cgatagcgag 60
ctggttgcgg aacgtcagca cgcgcgtgaa ctgacccgta aatataaccg taccaccgcg 120
accgagagcg accgtcgtga acgtctgctg gaggaactgt tcggtagcgt ggaggacgcg 180
accgttgaac cgccgatccg ttgcgattac ggttataacg ttcacgttgg cgagaacttc 240
tacgcgaact ttgactgcgt tattctggat gtgcgtcgtg ttgaatttgg cacccgttgc 300
ctgctgggtc cgggtgttca cgtttatacc gcgacccacc cgctggatgc ggaggaacgt 360
gcggcgggtc tggagagcgg tgcgccggtg accgttggtg acgatgtgtg gatcggtggc 420
cgtgcggttc tgaacagcgg cgtgagcttg gtgacggcag cgtgattgcg agcggtgcgg 480
tggttaccga agatgttccg gcgggcgcgc tggttggtgg caacccggcg cgtgtgctga 540
aggacgttga ttaa 554

<210> 19
<211> 563
<212> DNA
<213> 短乳杆菌(Lactobacillus brevis)
<400> 19
atggacaaga gcgagaagga aaaaatgatc accggcgagc tgttcaacgt gtacgatccg 60
gagctgttgc ggaacgtggc gcggcgcgtc agcaagtgga ggcgctgaac gagctgggtg 120
aacaggaccc ggaaaagagc cagcaactgg ttaaacgtct gttcggcgcg accggtgacc 180
aagttgaggt tcacgcgacc tttcgttgcg attacggcta taacatctac gtgggtgaaa 240
acttctttgc gaactatgac tgcaccattc tggatgttgc gccgatccgt attggcaagc 300
actgcctgct gggtccgaaa gtgcagattt acagcgttaa ccatccggcg gagccggaac 360
tgcgtcgtaa cggcgcgatg ggcattggca agccggtgac cctgggtgac gatgtgtggg 420
ttggtggcgg tgcgatcatc tgtccgggtg tgaccctggg tgataacgtg atcgttgcgg 480
cgggcgcggt ggttaccaag agcttcggta gcaacgtggt tctgggcggt aacccggcgc 540

gtgtgattaa gccgctgaaa taa 563

<210> 20

<211> 554

<212> DNA

<213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)

<400> 20

atgctgcgta ccgagaagga aaaaatggcg gcgggtgagc tgtacaacag cgaagaccag 60
caactgctgc tggagcgtaa gcacgcgcgt cagctgatcc gtcaatataa cgaaaccccg 120
gaagacgatg cggtgcgtac caagctgctg aaagaactgc tgggtagcgt gggcgatcag 180
gttaccatcc tgccgacctt ccgttgcgac tacggttatc acatccacat tggcgatcac 240
accttcgtga actttgactg cgttattctg gatgtgtgcg aggttcgtat cggctgccac 300
tgcctgattg cgccgggtgt tcacatctac accgcgggcc acccgctgga cccgattgag 360
cgtaagagcg gtaaagaatt tggcaaaccg gtgaccattg gtgatcaggt ttggatcggt 420
ggccgtgcgg tgattaatcc gggtgtgacc atcggcgaca acgcggtgat tgcgagcggc 480
agcgtggtta ccaaggatgt tccggcgaac accgggttgg tggcaacccg gcgcgtattc 540
tgaaacaact gtaa 554

<210> 21

<211> 563

<212> DNA

<213> 恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)

<400> 21

atgagcctga gcgagaagca caaaatgctg accggtcaac tgtatcatgc gggttgcccg 60
gagctgcaag cggaacaaat tgcgaacaag cactggatgc accgttataa caacagcgtg 120
gaactgtgaa cgacgcgcgt cacggtctgc tggttgagca cttcggccaa gtgggtgaag 180
gcgcggttat tcgtccgccg ttttactgcg actacggtta taacatcagc gtgggccgta 240
acaccttcat gaacttaact gcgtgatcct ggatgtggtt ccggttcgta tcggtgacga 300
ttgccagatt ggcccgaacg gcaaatctat accgcggacc acccgctgga cccggaagtg 360
cgtcgtagcg gtctggaaag cggccgtacc gtgaccattg gtgacaacgt ttggatcggt 420
ggcgcggcga tcattctgcc gggtgtgacc atcggcgaca acgcgattgt tggtgcgggc 480
agcgtggtta cccgtgatgt tccggcgggg cgaccgtggt tggtaacccg gcgcgtgttc 540
gtcagccgga tcagggtcaa taa 563

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sc-gpp2-F

<400> 22

tgctgcagag gaggtaattt atatgggatt gactactaaa cctctatc 48

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Sc-gpp2-R
<400> 23
cccaagctta ccatttcaac agatcgtcc 29
<210> 24
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pSTV28载体
<400> 24
atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 180
cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaatttc gtatggcaat gaaagacggt 240
gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa 300
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 420
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480
gccaatatgg acaacttctt cgcccccgtt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggcttccat 600
gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgtaa 660
660
<210> 25
<211> 636
<212> DNA
<213> 蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)
<400> 25
atggacttcc accagatcga cattgatcgt tggaaccgta agccgtactt tgagcactat 60
atcaaggggt aagtgcagct acagcgtgac cgcgaacctg aacgttaccg cgctgctgaa 120
cggcctgcta aaaaaacatg aagctgtacc cggcgttcat ctatatgatt agccgtgtgg 180
ttaacagcca catcgagtcc gtaccgcgtt taacgataag ggtcagctgg gctactggga 240
acaaatggtg ccgacctata cattttccac aaagaggaca aaacctttag cgcgatgtgg 300
accgaataca gcagcgattt cagccttttt acaagaacta cctgcaagac atcgatcgtt 360
atggtgacaa gaaaggcctg tgggtgaaag gaacgttccg gcgcacacct tcagcattag 420

cgcgctgccg tgggttagct tcaccggttt tcaacgaacc tgtacaacgg cgagtatctg 480
ctgccgatca ttaccctggg caagtacttt agcgatggca aaccgtgtgc ctgccgatca 540
gcctgcaagt tcaccacgcg gtttgcgacg gttatcacgt tagagttcat taacgaactg 600
caaaaactgg cggatagctt tgaggaatgg ctgtaa 636

<210> 26
<211> 633
<212> DNA
<213> 铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)
<400> 26
atgagctaca cccgtgttga catcagcagc tggaaccgtc gtgagcactt tgaaattttc 60
cgtggtatgg ccaatgcacc tttagccaga ccgttcaact ggacatcacc cgtctgctgg 120
atttcacccg taccgtggtt accgttttta tccggtgttc atccacagca ttgcgaaggt 180
ggttaaccgt ttcccgggta ccgtatggcg atgaaaggcg acgaactgat tgtgtgggat 240
tgcgttcacc cgaactatac cacctttcac ccggacaccg aaacctttag cagcttctgg 300
agccactacc acgacgatct ggcgcgttcc tggcggagta tagcatggac cgtgaaaagt 360
accgtaacga tcacagctat tttccgaaag gttcatcgaa aacgtgtttt atgttagcgc 420
gaacccgtgg gttagcttca ccagcttcga ttttaacttc gcgagcgcga acaacttctt 480
tgcgccgctg tttaccgtgg gcaagtacta tagccaagcg ggtaaaaccc tggtgccgct 540
ggcggtgcaa gttcaccatg cggtttgcga tggttttcat gcggccgtct ggtgaccgag 600
ctgcaaaagc tgtgcgatga agcgggtggc taa 633

<210> 27
<211> 655
<212> DNA
<213> 丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylicum)
<400> 27
atgaacagca acttccacgc gatcgacatg aacacctacc cgcgtgcgca cacctacaac 60
tattttacaa gaccgtgagc accctgatct atagcatcaa cattaccctg gatgttacca 120
ttctgcgtgc gacctgaaga acaaaggtct gaaattcttt ccggcgtacg tgtatctggt 180
tacccgtgcg atcggtcgca ccaggagttc ctgatggcga ttcaaaacga catgctgggc 240
tactgggatt gccgtacccc gtctatccga tctttcacga ggacgataag accattacct 300
ttctgtggac cgagtacaac gaagactcga ggtgttttac aagaactaca tcagcgatat 360
tcgtgaatac ggtaacaacc acggcatcat gcgagcaagg acgctccgcc gagcaacaac 420
tacatcatta gctgcattcc gtggttcagc tttaacacct gagcatgcag ctgcaaaacg 480
cgaaaaacta ctatgcgccg atcttcgaag cgggtcgttt taccgaaacc aacggcatca 540
ttaccctgcc gctgagcatc accgtgaacc acgcgaccgt tgacgctacc acattaagct 600
gctgctggat gagctgcaat ggagcatgag ccacccgaaa gagtggattc gttaa 655

<210> 28
<211> 680
<212> DNA

<213> 脓肿分枝杆菌(Mycobacterium abscessus)

<400> 28

atgccggcgg agcacgcgct gctggttgtg atggcgacct tcgaaccgct ggacctgcaa 60
caatgccgcg tcgtgagtgg tttgaacact acctggatcg ttgcccgacc tactatagca 120
tgaccgtgga ctggacatca ccaacctgcg tgcggcggtt gacgcgagcg gtcgtaagac 180
ctatccgacc cagattgggc gctggcgacc gtggttaacc gtcacccgga gttccgtatg 240
gcgctggacg atcaaggtat ccgggtgtgt gggacgtggt tgatccggcg ttcaccgttt 300
ttaacccgga ccgtgaaacc ttgcgggtat cagcgcgcgt tacaccccgg acttcgatgc 360
gtttcacagc gaggcggcgg aactgcgagc gaatatcgta acgcgagcac cctgttcccg 420
cagggcgcgc cgcgtccgcg taacgtgttg acatcagcag cattccgtgg acccgtttca 480
ccggttttac cctgaccatt gcgccgggtt ggggcacctg gcgccgatct tcaccattgg 540
taaattttac gagcaggaag gccgtaccat gatgccgcgg cgctgcaaat tcaccatgcg 600
gcggcggacg gctatcacag cgcgcgtctg gtggaggaac tcgtcaaatc attgcggacc 660
cggattgggt tcgtgattaa 680

<210> 29

<211> 663

<212> DNA

<213> 短乳杆菌(Lactobacillus brevis)

<400> 29

atgaccgagc tgaacaccca tgcgaccccg attgaccaga ccacctgggc gcgtcgtgaa 60
tacttcacta cttcaccaag atgatgccga ccggtttcac cctgaacgtg gacatggaca 120
tcaccgcgac caaagcgtgg ctgaccaagc acgatcgtaa attcaacccg gcgtacctgt 180
atctggttac caagctatta ccaaacaccc ggagtttcgt gtgggtcagg ttgacggcca 240
actggtggaa tacgatgttc tgcacccgag ctatagcacc tttcacggtg acgatctgac 300
cattagcaac ctgtggaccg cgtatacccg agcttcgagc agtttcacca aaactacctg 360
gcggaccagg cgacctatgg cgatcaacat accccgatgc cgaaggcgcc gcaaggtgcg 420
aacacctaca tgatcggcag cattccgtgg acccacttca acagctatac cccgctgccg 480
tttaccccgc tgaacacctt ctttccggtg atccaggcgg tcgtttcacc tttaaagatg 540
gccaatggct gatgccgctg agcttcacca ttcaccacgc ggtgcggacg gctaccacgt 600
tagccagttc tttaacgagc tgcaacgtgt ttttgatcac ccggaacttg gctgaccgcg 660
taa 663

<210> 30

<211> 960

<212> DNA

<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)

<400> 30

atgaagccgg aaaacaaact acctgttctg gaccttattt ctgctgaaat gaagaccgtt 60
gtgaatactc ttcagccgga tttaccgccc tggcccgcaa cgggaacgat tgctgagcaa 120
cgacagtatt acacgcttga gcgccgattc tggaatgcgg gcgctccaga aatggcaacc 180

agagcttaca tggttccaac aaaatatggg caggtggaaa cacgtctctt ttgtccgcag 240
ccagatagcc cagcgacgct attttatttg catggaggcg gttttattct cggcaatctc 300
gatacccacg atcgcatcat gcgcctgctg gcaagctaca gccaatgtac ggtgattggt 360
attgattaca ccctttcacc tgaagcgcgt tttccgcaag cgatagagga aattgtggct 420
gcttgttgtt atttccacca gcaggcggag gattatcaaa tcaatatgtc ccgcattggc 480
tttgccggtg attccgcagg tgccatgctg gcgctcgcca gtgcgttgtg gttgcgtgat 540
aaacagatcg attgcggtaa agttgcgggc gttttgctgt ggtatgggct ttacggatta 600
cgggattccg tgactcgtcg tctgttgggc ggtgtctggg atggcttaac gcaacaggat 660
ttgcagatgt acgaagaggc atatttaagc aacgacgcgg accgcgagtc gccgtattac 720
tgtctgttta ataatgatct cactcgcgaa gttccgccct gttttattgc cggggcggag 780
ttcgatccgc tgctggatga cagccgtctg ctttaccaga cgttagcggc gcatcagcag 840
ccctgtgagt tcaaactcta cccaggcacg ctgcacgcct ttttgcatta ttcacggatg 900
atgaaaaccg ccgacgaggc tcttcgcgac ggcgctcagt tctttaccgc tcagctttaa 960
960

<210> 31
<211> 1176
<212> DNA
<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)
<400> 31

atgtctgctg ctgctgatag attaaactta acttccggcc acttgaatgc tggtagaaag 60
agaagttcct cttctgtttc tttgaaggct gccgaaaagc ctttcaaggt tactgtgatt 120
ggatctggta actggggtac tactattgcc aaggtggttg ccgaaaattg taagggatac 180
ccagaagttt tcgctccaat agtacaaatg tgggtgttcg aagaagagat caatggtgaa 240
aaattgactg aaatcataaa tactagacat caaaacgtga aatacttgcc tggcatcact 300
ctacccgaca atttggttgc taatccagac ttgattgatt cagtcaagga tgtcgacatc 360
atcgttttca acattccaca tcaatttttg ccccgtatct gtagccaatt gaaaggtcat 420
gttgattcac acgtcagagc tatctcctgt ctaaagggtt ttgaagttgg tgctaaaggt 480
gtccaattgc tatcctctta catcactgag gaactaggta ttcaatgtgg tgctctatct 540
ggtgctaaca ttgccaccga agtcgctcaa gaacactggt ctgaaacaac agttgcttac 600
cacattccaa aggatttcag aggcgagggc aaggacgtcg accataaggt tctaaaggcc 660
ttgttccaca gaccttactt ccacgttagt gtcatcgaag atgttgctgg tatctccatc 720
tgtggtgctt tgaagaacgt tgttgcctta ggttgtggtt tcgtcgaagg tctaggctgg 780
ggtaacaacg cttctgctgc catccaaaga gtcggtttgg gtgagatcat cagattcggt 840
caaatgtttt tcccagaatc tagagaagaa acatactacc aagagtctgc tggtgttgct 900
gatttgatca ccacctgcgc tggtggtaga aacgtcaagg ttgctaggct aatggctact 960
tctggtaagg acgcctggga atgtgaaaag gagttgttga atggccaatc cgctcaaggt 1020
ttaattacct gcaaagaagt tcacgaatgg ttggaaacat gtggctctgt cgaagacttc 1080
ccattatttg aagccgtata ccaaatcgtt tacaacaact acccaatgaa gaacctgccg 1140
gacatgattg aagaattaga tctacatgaa gattag 1176

<210> 32
<211> 753
<212> DNA
<213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)
<400> 32
atgggattga ctactaaacc tctatctttg aaagttaacg ccgctttgtt cgacgtcgac 60
ggtaccatta tcatctctca accagccatt gctgcattct ggagggattt cggtaaggac 120
aaaccttatt tcgatgctga acacgttatc caagtctcgc atggttggag aacgtttgat 180
gccattgcta agttcgctcc agactttgcc aatgaagagt atgttaacaa attagaagct 240
gaaattccgg tcaagtacgg tgaaaaatcc attgaagtcc caggtgcagt taagctgtgc 300
aacgctttga acgctctacc aaaagagaaa tgggctgtgg caacttccgg tacccgtgat 360
atggcacaaa aatggttcga gcatctggga atcaggagac caaagtactt cattaccgct 420
aatgatgtca aacagggtaa gcctcatcca gaaccatatc tgaagggcag gaatggctta 480
ggatatccga tcaatgagca agacccttcc aaatctaagg tagtagtatt tgaagacgct 540
ccagcaggta ttgccgccgg aaaagccgcc ggttgtaaga tcattggtat tgccactact 600
ttcgacttgg acttcctaaa ggaaaaaggc tgtgacatca ttgtcaaaaa ccacgaatcc 660
atcagagttg gcggctacaa tgccgaaaca gacgaagttg aattcatttt tgacgactac 720
ttatatgcta aggacgatct gttgaaatgg taa 753
<210> 33
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-lacA-F
<400> 33
ctggatccag gaggtaataa aatggaacat gccaatgacc g 41
<210> 34
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-lacA-R
<400> 34
gtttctagat taaactgacg attcaacttt ataatc 36
<210> 35
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> Ec-cysE-F
<400> 35
ctggatccag gaggtaataa aatgtcgtgt gaagaactgg aaattg 46
<210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-cysE-R
<400> 36
gtttctagat tagatcccat ccccatactc 30
<210> 37
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-yjgm-F
<400> 37
ctggatccag gaggtaataa aatgaataac attgcgccgc 40
<210> 38
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-yjgM-R
<400> 38
gtttctagat tagagttcgc gcaacatcc 29
<210> 39
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-yjaB-F
<400> 39
ctggatccag gaggtaataa aatggttatt agtattcgcc gctc 44
<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Ec-yjaB-R
<400> 40
gtttctagat tacgcccca catacgc 27
<210> 41
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-yiiD-F
<400> 41
ctggatccag gaggtaataa aatgagccag cttccaggg 39
<210> 42
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-nhoA-F
<400> 42
ctggatccag gaggtaataa aatgacgccc attctgaatc ac 42
<210> 43
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-nhoA-R
<400> 43
gtttctagat tattttcccg cctccggg 28
<210> 44
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-wecH-F
<400> 44
ctggatccag gaggtaataa aatgcagccc aaaatttact gg 42
<210> 45
<211> 34
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-WecH-R
<400> 45
gtttctagat taactcacta atctgtttct gtcg 34
<210> 46
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-yiiD-R
<400> 46
gtttctagat tactcttctt cgttcccgc 29
<210> 47
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-maa-F
<400> 47
ctggatccag gaggtaataa aatgagcaca gaaaaagaaa agatg 45
<210> 48
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-maa-R
<400> 48
gtttctagat tacaattttt taattattct ggctg 35
<210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Sc-maa-F
<400> 49
ctggatccag gaggtaataa aatgaccacc gagaaggaaa aaatg 45
<210> 50
<211> 29

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Sc-maa-R
<400> 50
gtttctagat taatccagcg gcacttcac 29
<210> 51
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Hj-maa-F
<400> 51
ctggatccag gaggtaataa aatgaccagc gagaaggaac g 41
<210> 52
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Hj-maa-R
<400> 52
gtttctagat taatcaacgt ccttcagcac a 31
<210> 53
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Lb-maa-F
<400> 53
ctggatccag gaggtaataa aatggacaag agcgagaagg 40
<210> 54
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Lb-maa-R
<400> 54
gtttctagat tatttcagcg gcttaatcac 30
<210> 55

<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Pp-maa-F
<400> 55
ctggatccag gaggtaataa aatgagcctg agcgagaagc ac 42
<210> 56
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Pp-maa-R
<400> 56
gtttctagat tattgaccct gatccggctg 30
<210> 57
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Bs-maa-F
<400> 57
ctggatccag gaggtaataa aatgctgcgt accgagaagg 40
<210> 58
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Bs-maa-R
<400> 58
gtttctagat tacagttgtt tcagaatacg cgc 33
<210> 59
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Sc-gpd1-R
<400> 59
aatgctgcag ttaatcttca tgtagatcta attcttcaat c 41

<210> 60
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Cat-F
<400> 60
ctaggagctc aggagaaata taatggagaa aaaaatcact ggatatac 48
<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Cat-R
<400> 61
ctggatcctt acgccccgcc ctgcc 25
<210> 62
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Trc-Bs.maa-F
<400> 62
agatctgagt cgacagtatc ggcggg 26
<210> 63
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Trc-Bs.maa-R
<400> 63
tatatttctc ctgaggatcc ccgggtaccg 30
<210> 64
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Bc-Oat-F
<400> 64

ctcggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatggactt ccaccagatc 50

<210> 65

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Bc-Oat-R

<400> 65

cccgccgata ctgtcgacag atcttacagc cattcctcaa ag 42

<210> 66

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ca-Oat-F

<400> 66

ctcggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgaacag caacttccac 50

<210> 67

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ca-Oat-R

<400> 67

cccgccgata ctgtcgacag atcttaacga atccactctt tc 42

<210> 68

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Lb-Oat-F

<400> 68

ctcggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgaccga gctgaacacc c 51

<210> 69

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Lb-Oat-R

<400> 69
cccgccgata ctgtcgacag atcttacgcg gtcagccaca g 41
<210> 70
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ma-Oat-F
<400> 70
ctcggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgccggc ggagcacgcg 50
<210> 71
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ma-Oat-R
<400> 71
cccgccgata ctgtcgacag atcttaatca cgaacccaat ccgggtccg 49
<210> 72
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Pa-Oat-F
<400> 72
ctcggtaccc ggggatcctc aggagaaata taatgagcta cacccgtgtt g 51
<210> 73
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Pa-Oat-R
<400> 73
cccgccgata ctgtcgacag atcttagcca cccgcttcat c 41
<210> 74
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> Ec-aes-F
<400> 74
ctggatccgt cacccaaccc tttatgaagc cggaaaacaa actacc 46
<210> 75
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Ec-aes-R
<400> 75
tatcgtcgac ttaaagctga gcggtaaaga actg 34
<210> 76
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Sc-gpd1-F
<400> 76
gcggatccag gaggtaataa aatgtctgct gctgctgata gattaaac 48
<210> 77
<211> 2999
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> pSTV28载体
<400> 77
aaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggtctggtt 120
ataggtacat tgagcaactg actgaaatgc ctcaaaatgt tctttacgat gccattggga 180
tatatcaacg gtggtatatc cagtgatttt tttctccatt ttagcttcct tagctcctga 240
aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt 300
ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc 360
ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420
ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480
gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
aaggctgcac cggtgcgtca gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttcctcgctc 720
actgactcgc tacgctcggt cgttcgactg cggcgagcgg aaatggctta cgaacggggc 780

ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840
agccgttttt ccataggctc cgccccccctg acaagcatca cgaaatctga cgctcaaatc 900
agtggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccctg gcggctccct 960
cgtgcgctct cctgttcctg cctttcggtt taccggtgtc attccgctgt tatggccgcg 1020
tttgtctcat tccacgcctg acactcagtt ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact 1080
gtatgcacga acccccccgtt cagtccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 1140
agtccaaccc ggaaagacat gcaaaagcac cactggcagc agccactggt aattgattta 1200
gaggagttag tcttgaagtc atgcgccggt taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt 1260
gactgcgctc ctccaagcca gttacctcgg ttcaaagagt tggtagctca gagaaccttc 1320
gaaaaaccgc cctgcaaggc ggtttttttcg ttttcagagc aagagattac gcgcagacca 1380
aaacgatctc aagaagatca tcttattaat cagataaaat atttctagat ttcagtgcaa 1440
tttatctctt caaatgtagc acctgaagtc agccccatac gatataagtt gtaattctca 1500
tgtttgacag cttatcatcg ataagctcat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa 1560
gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca 1620
aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc 1680
agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat ccccgggtac cgagctcgaa 1740
ttcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 1800
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 1860
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 1920
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattggaa cgccatgagc 1980
ggcctcattt cttattctga gttacaacag tccgcaccgc tgtccggtag ctccttccgg 2040
tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc 2100
gtaggacagg tgccggcagc gcccaacagt cccccggcca cggggcctgc caccataccc 2160
acgccgaaac aagcgccctg caccattatg ttccggatct gcatcgcagg atgctgctgg 2220
ctaccctgtg gaacacctac atctgtatta acgaagcgct aaccgttttt atcaggctct 2280
gggaggcaga ataaatgatc atatcgtcaa ttattacctc cacggggaga gcctgagcaa 2340
actggcctca ggcatttgag aagcacacgg tcacactgct tccggtagtc aataaaccgg 2400
taaaccagca atagacataa gcggctattt aacgaccctg ccctgaaccg acgaccgggt 2460
cgaatttgct ttcgaatttc tgccattcat ccgcttatta tcacttattc aggcgtagca 2520
ccaggcgttt aagggcacca ataactgcct taaaaaaatt acgccccgcc ctgccactca 2580
tcgcagtact gttgtaattc attaagcatt ctgccgacat ggaagccatc acaaacggca 2640
tgatgaacct gaatcgccag cggcatcagc accttgtcgc cttgcgtata tatttgccc 2700
atggtgaaaa cgggggcgaa gaagttgtcc atattggcca cgtttaaatc aaaactggtg 2760
aaactcaccc agggattggc tgagacgaaa aacatattct caataaaccc tttagggaaa 2820
taggccaggt tttcaccgta acacgccaca tcttgcgaat atatgtgtag aaactgccgg 2880
aaatcgtcgt ggtattcact ccagagcgat gaaaacgttt cagtttgctc atggaaaacg 2940
gtgtaacaag ggtgaacact atcccatatc accagctcac cgtctttcat tgccatacg 2999

<210> 78

<211> 4176

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pTrc99A载体

<400> 78

gtttgacagc ttatcatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc 60
ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc 120
gcactcccgt tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc 180
tgaaatgagc tgttgacaat taatcatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga 240
taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg aattcgagct cggtacccgg ggatcctcta 300
gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 360
tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 420
gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg 480
atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga 540
aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc 600
ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg 660
tggcgggcag gacgcccgcc ataaactgcc aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg 720
acggatggcc ttttgcgtt tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa 780
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 840
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc 900
ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 960
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 1020
gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 1080
tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 1140
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 1200
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 1260
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 1320
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 1380
cgatgcctac agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 1440
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 1500
tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 1560
ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 1620
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 1680
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 1740
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 1800
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 1860
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 1920
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc 1980
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 2040

agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc 2100
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 2160
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 2220
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 2280
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 2340
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 2400
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 2460
ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 2520
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 2580
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 2640
cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 2700
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc 2760
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc 2820
gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg 2880
gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agcagatcaa 2940
ttcgcgcgcg aaggcgaagc ggcatgcatt tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc 3000
tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa 3060
ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc 3120
gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg 3180
gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg 3240
ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg 3300
attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc 3360
ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg 3420
atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat 3480
gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca tcaacagtat tattttctcc 3540
catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc 3600
gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat 3660
aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc 3720
atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg 3780
ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg 3840
cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat 3900
atcccgccgt taaccaccat caaacaggat tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac 3960
cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca 4020
ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 4080
gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 4140
caacgcaatt aatgtgagtt agcgcgaatt gatctg 4176

<210> 79
<211> 5369
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pET28a (+)载体

<400> 79

atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aacccctcaa gacccgttta gaggccccaa 60
ggggttatgc tagttattgc tcagcggtgg cagcagccaa ctcagcttcc tttcgggctt 120
tgttagcagc cggatctcag tggtggtggt ggtggtgctc gagtgcggcc gcaagcttgt 180
cgacggagct cgaattcgga tccgcgaccc atttgctgtc caccagtcat gctagccata 240
tggctgccgc gcggcaccag gccgctgctg tgatgatgat gatgatggct gctgcccatg 300
gtatatctcc ttcttaaagt taaacaaaat tatttctaga ggggaattgt tatccgctca 360
caattcccct atagtgagtc gtattaattt cgcgggatcg agatctcgat cctctacgcc 420
ggacgcatcg tggccggcat caccggcgcc acaggtgcgg ttgctggcgc ctatatcgcc 480
gacatcaccg atggggaaga tcgggctcgc cacttcgggc tcatgagcgc ttgtttcggc 540
gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttgg gcgccatctc cttgcatgca 600
ccattccttg cggcggcggt gctcaacggc ctcaacctac tactgggctg cttcctaatg 660
caggagtcgc ataagggaga gcgtcgagat cccggacacc atcgaatggc gcaaaacctt 720
tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga gagtcaattc agggtggtga atgtgaaacc 780
agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatgc cggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt 840
ggtgaaccag gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc 900
ggagctgaat tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct 960
gattggcgtt gccacctcca gtctggccct gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcggcgat 1020
taaatctcgc gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg 1080
cgtcgaagcc tgtaaagcgg cggtgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat 1140
cattaactat ccgctggatg accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt 1200
tccggcgtta tttcttgatg tctctgacca gacacccatc aacagtatta ttttctccca 1260
tgaagacggt acgcgactgg gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc 1320
gctgttagcg ggcccattaa gttctgtctc ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa 1380
atatctcact cgcaatcaaa ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat 1440
gtccggtttt caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct 1500
ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg 1560
cgttggtgcg gatatctcgg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat 1620
cccgccgtta accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg 1680
cttgctgcaa ctctctcagg gccaggcggt gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact 1740
ggtgaaaaga aaaaccaccc tggcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 1800
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 1860
acgcaattaa tgtaagttag ctcactcatt aggcaccggg atctcgaccg atgcccttga 1920
gagccttcaa cccagtcagc tccttccggt gggcgcgggg catgactatc gtcgccgcac 1980
ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca 2040
ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat 2100

tcggaatctt gcacgccctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgccacc aaacgtttcg 2160
gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccccacg ggtgcgcatg atcgtgctcc 2220
tgtcgttgag gacccggcta ggctggcggg gttgccttac tggttagcag aatgaatcac 2280
cgatacgcga gcgaacgtga agcgactgct gctgcaaaac gtctgcgacc tgagcaacaa 2340
catgaatggt cttcggtttc cgtgtttcgt aaagtctgga aacgcggaag tcagcgccct 2400
gcaccattat gttccggatc tgcatcgcag gatgctgctg gctaccctgt ggaacaccta 2460
catctgtatt aacgaagcgc tggcattgac cctgagtgat ttttctctgg tcccgccgca 2520
tccataccgc cagttgttta ccctcacaac gttccagtaa ccgggcatgt tcatcatcag 2580
taacccgtat cgtgagcatc ctctctcgtt tcatcggtat cattaccccc atgaacagaa 2640
atccccctta cacggaggca tcagtgacca aacaggaaaa aaccgccctt aacatggccc 2700
gctttatcag aagccagaca ttaacgcttc tggagaaact caacgagctg gacgcggatg 2760
aacaggcaga catctgtgaa tcgcttcacg accacgctga tgagctttac cgcagctgcc 2820
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 2880
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 2940
ttggcgggtg tcggggcgca gccatgaccc agtcacgtag cgatagcgga gtgtatactg 3000
gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatat gcggtgtgaa 3060
ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc gctcttccgc ttcctcgctc 3120
actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg 3180
gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc 3240
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttcca taggctccgc 3300
ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga 3360
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc 3420
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat 3480
agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg 3540
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc 3600
aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga 3660
gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact 3720
agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt 3780
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag 3840
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg 3900
tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgaa caataaaact 3960
gtctgcttac ataaacagta atacaagggg tgttatgagc catattcaac gggaaacgtc 4020
ttgctctagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc 4080
tcgcgataat gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcga ttgtatggga agcccgatgc 4140
gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat 4200
ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg 4260
tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc gggaaaacag cattccaggt 4320
attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttcctgcg 4380
ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct 4440

cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga 4500
gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt tgccattctc 4560
accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcacttgat aaccttattt ttgacgaggg 4620
gaaattaata ggttgtattg atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct 4680
tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca 4740
aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctcgatga 4800
gtttttctaa gaattaattc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 4860
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgaaattgta aacgttaata 4920
ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc atttttaac caataggccg 4980
aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgttgttc 5040
cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa 5100
ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt 5160
cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag cccccgattt agagcttgac 5220
ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta 5280
gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg 5340
cgccgctaca gggcgcgtcc cattcgcca 5369

<210> 80
<211> 612
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 80
atgaacatgc caatgaccga aagaataaga gcaggcaagc tatttaccga tatgtgcgaa 60
ggcttaccgg aaaaaagact tcgtgggaaa acgttaatgt atgagtttaa tcactcgcat 120
ccatcagaag ttgaaaaaag agaaagcctg attaaagaaa tgtttgccac ggtaggggaa 180
aacgcctggg tagaaccgcc tgtctatttc tcttacggtt ccaacatcca tataggccgc 240
aatttttatg caaatttcaa tttaaccatt gtcgatgact acacggtaac aatcggtgat 300
aacgtactga ttgcacccaa cgttactctt tccgttacgg gacaccctgt acaccatgaa 360
ttgagaaaaa acggcgagat gtactctttt ccgataacga ttggcaataa cgtctggatc 420
ggaagtcatg tggttattaa tccaggcgtc accatcgggg ataattctgt tattggcgcg 480
ggtagtatcg tcacaaaaga cattccacca aacgtcgtgg cggctggcgt tccttgtcgg 540
gttattcgcg aaataaacga ccgggataag cactattatt tcaaagatta taaagttgaa 600
tcgtcagttt aa 612

<210> 81
<211> 822
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 81
atgtcgtgtg aagaactgga aattgtctgg aacaatatta aagccgaagc cagaacgctg 60
gcggactgtg agccaatgct ggccagtttt taccacgcga cgctactcaa gcacgaaaac 120

cttggcagtg cactgagcta catgctggcg aacaagctgt catcgccaat tatgcctgct 180
attgctatcc gtgaagtggt ggaagaagcc tacgccgctg acccggaaat gatcgcctct 240
gcggcctgtg atattcaggc ggtgcgtacc cgcgacccgg cagtcgataa atactcaacc 300
ccgttgttat acctgaaggg ttttcatgcc ttgcaggcct atcgcatcgg tcactggttg 360
tggaatcagg ggcgtcgcgc actggcaatc tttctgcaaa accaggtttc tgtgacgttc 420
caggtcgata ttcacccggc agcaaaaatt ggtcgcggta tcatgcttga ccacgcgaca 480
ggcatcgtcg ttggtgaaac ggcggtgatt gaaaacgacg tatcgattct gcaatctgtg 540
acgcttggcg gtacgggtaa atctggtggt gaccgtcacc cgaaaattcg tgaaggtgtg 600
atgattggcg cgggcgcgaa aatcctcggc aatattgaag ttgggcgcgg cgcgaagatt 660
ggcgcaggtt ccgtggtgct gcaaccggtg ccgccgcata ccaccgccgc tggcgttccg 720
gctcgtattg tcggtaaacc agacagcgat aagccatcaa tggatatgga ccagcatttc 780
aacggtatta accatacatt tgagtatggg gatgggatct aa 822

<210> 82
<211> 996
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 82

atgcagccca aaatttactg gattgataac ctgcgaggga tagcgtgttt aatggtggtg 60
atgattcaca ccactacctg gtatgtgacc aatgctcata gtgttagccc cgtcacatgg 120
gatatcgcca atgttctgaa ttctgcctct cgtgtcagcg tgccgctatt tttcatgatt 180
tccggctatc tctttttttgg cgaacgcagc gcccagccgc gccatttctt gcgtatcggc 240
ttatgtctga ttttttatag cgcaatcgca ctgctctaca ttgcgctgtt tacctccatc 300
aatatggagt tagcgctgaa aaacctgctg caaaagccag tgttttacca cttgtggttt 360
ttcttcgcga ttgcggtgat ttatctggtt tcaccgctga ttcaggtgaa gaacgtcggc 420
ggaaaaatgt tgctggtgct aatggcggtg attggcatta tcgctaaccc aaacacagtg 480
ccgcagaaaa ttgacggttt tgaatggctg ccaattaact tatatatcaa tggcgatact 540
ttttactaca ttctgtatgg catgttgggc cgcgctatag ggatgatgga cacacagcat 600
aaagcactgt cgtgggtgag cgccgcgctg tttgcgacgg gggtttttat tatctctcgc 660
gggacattat atgaattgca gtggcgcgga aattttgccg atacctggta tctttactgt 720
gggccgatgg tttttatctg cgcaatcgcg ctattgactc tggttaaaaa cacgctggat 780
acgcgtacca ttcgcggact tggcttaatc tcccgccatt cattgggtat atacggattc 840
cacgccttga ttatccatgc gctgcgcacc cggggaattg agcttaaaaa ttggccaata 900
ctggatatta tttggatctt ttgcgcgacg ttggcagcga gtttgttact ttctatgctg 960
gtacaacgaa tcgacagaaa cagattagtg agttaa 996

<210> 83
<211> 846
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 83

atgacgccca ttctgaatca ctattttgcc cgtattaact ggtcgggagc tgctgcggtc 60
aatattgata cgcttcgtgc attgcacctg aaacacaatt gcaccattcc gtttgaaaac 120
ctcgacgttt tgctgccgag ggaaatacag cttgataatc aatcgccgga agagaaactg 180
gtgatagccc gtcgtggcgg ttactgtttt gagcagaatg gcgtgtttga gcgggtgtta 240
cgcgagctgg ggtttaacgt tcgcagcttg ttagggcgcg tagtgttatc aaatccgcca 300
gcattaccgc cgcgcaccca tcgtttgctg ttggtggaac tggaagagga aaaatggatt 360
gctgatgtcg gtttcggtgg gcagacgcta accgcgccga ttcgtttagt ttccgatctc 420
gtgcagacca cgccacacgg agagtatcgg ttgttgcagg agggtgatga ttgggtgttg 480
cagtttaatc atcatcagca ttggcagtcg atgtaccgtt ttgatctctg cgagcagcaa 540
caaagcgatt atgtgatggg caatttctgg tcggcgcact ggccgcagtc gcattttcgc 600
catcatttgc tgatgtgccg ccatttgccg gacggcggca agctgacact gaccaatttt 660
cattttaccc attatgaaaa tgggcacgcg gtggagcagc gaaatctacc ggatgtggcg 720
tcattatatg ctgtgatgca agaacagttt ggtctgggcg tggatgatgc gaaacatggc 780
tttaccgtgg atgagttagc gctggtgatg gcggcgtttg atacgcaccc ggaggcggga 840
aaataa 846

<210> 84
<211> 504
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 84
atgaataaca ttgcgccgca atcacctgta atgcgtcgcc tgacgctgca ggataatcct 60
gctatcgccc gcgtcattcg tcaggtatcc gccgaatacg gtcttaccgc tgataaaggc 120
tacaccgtcg ccgatccgaa tcttgacgag ctgtatcaag tatatagtca gcctggccat 180
gcatattggg tcgttgagta cgagggtgaa gtggtcggcg gcggtgggat agcgccatta 240
accgggagtg agtcggatat ttgcgaactg caaaagatgt attttcttcc ggctatccgc 300
ggcaaagggc tggcaaaaaa actggcctta atggcgatgg agcaggcgcg agagatgggt 360
ttcaaacgct gctatctgga aacgaccgct tttttaaagg aagccattgc gctttatgag 420
catttgggct ttgagcatat cgactatgcg cttggctgca cgggccatgt cgattgtgaa 480
gtgcggatgt tgcgcgaact ctaa 504

<210> 85
<211> 444
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 85
atggttatta gtattcgccg ctcacggcat gaggaagggg aggaactcgt tgcgatttgg 60
tgtcgttctg tcgatgccac tcacgatttt ctatcagcag agtatcggac cgagctggag 120
gacctagttc gttccttcct gccggaagcg ccgttgtggg tcgcggttaa tgagcgggat 180
cagccggttg gatttatgtt gctaagtggg cagcatatgg atgcgctgtt tatcgatcct 240
gatgtgcgcg gctgcggcgt aggtcgggtg ctggtggagc atgcgctctc gatggcaccg 300

gaactgacaa ccaacgttaa tgagcaaaat gagcaggcgg ttgggttcta taagaaggtg 360
ggttttaagg ttacgggacg ctctgaggtg gacgatttgg ggaaaccgta tccgttgctg 420
aatctggcgt atgtgggggc gtaa 444

<210> 86
<211> 990
<212> DNA
<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)
<400> 86

atgagccagc ttccagggtt gtcacgggaa acaagagaga gtatcgctat gtatcacctt 60
cgggttccac aaacagaaga agaattagag cgttactatc agtttcgctg ggaaatgttg 120
cgtaagcccc tgcatcaacc aaaaggttcg gaacgcgacg cgtgggatgc gatggcgcat 180
caccagatgg tcgtcgacga gcagggtaat ctggtggcgg taggccgact gtatattaat 240
gccgacaatg aagcgtccat tcgctttatg gccgttcatc ccgacgtgca ggacaaaggg 300
ttaggcacgc tgatggcgat gaccctggag tcggtggcgc gtcaggaagg cgttaagcgc 360
gtgacctgta gcgcccgtga agacgcggtg gagttttcg ccaagctggg gtttgttaat 420
cagggagaaa tcaccacgcc aaccaccacg ccgattcgcc atttttgat gattaagccc 480
gtcgccactc tggatgacat tctgcatcgc ggcgactggt gcgcgcagct gcaacaggcg 540
tggtacgaac atatcccgct tagtgaaaaa atgggcgtgc gcattcagca atataccggg 600
caaaaattta tcactaccat gccagaaacc ggcaatcaga atccgcacca tacgctgttt 660
gccgggagtt tattctcact ggcgacgctc actggttggg gacttatctg gctgatgctg 720
cgtgaacgcc acctcggcgg aacgattatt cttgcggatg cgcatatccg ctacagcaag 780
ccgattagcg gtaaacctca tgcggtagcc gacctcggtg ccttaagcgg cgatctcgac 840
cgtctggcgc gcggacgaaa agcacgggtg cagatgcagg tcgaaatctt tggcgacgag 900
acgccgggtg cagtgtttga aggcacgtat atcgttctgc ccgcgaagcc atttggcccg 960
tatgaagagg gcgggaacga agaagagtaa 990

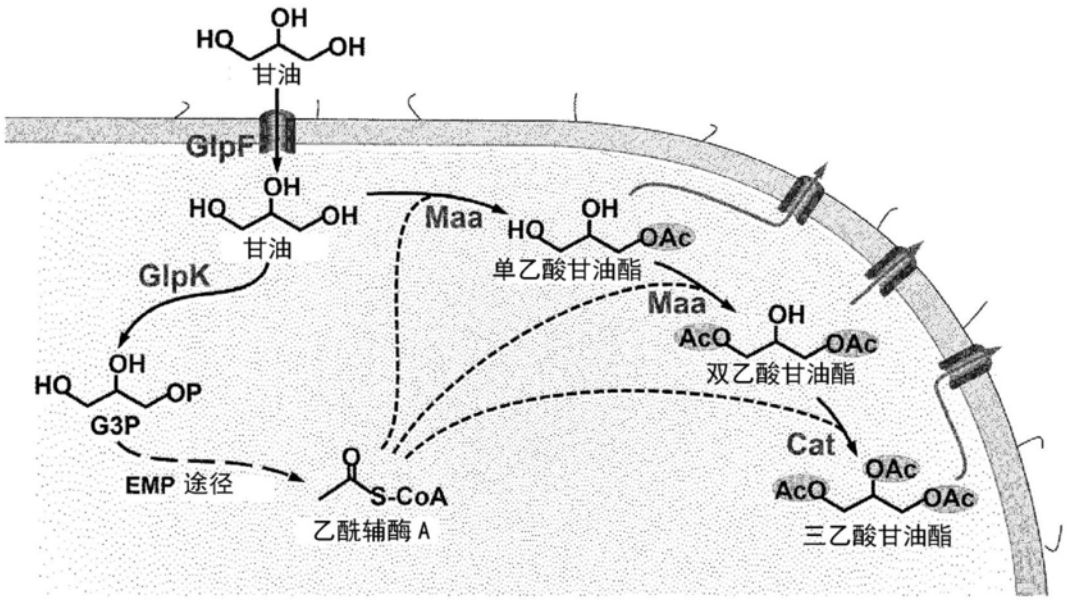

甘油
GlpF
甘油
Maa
单乙酸甘油酯
GlpK
Maa
双乙酸甘油酯
G3P
EMP 途径
乙酰辅酶 A
Cat
三乙酸甘油酯

图1

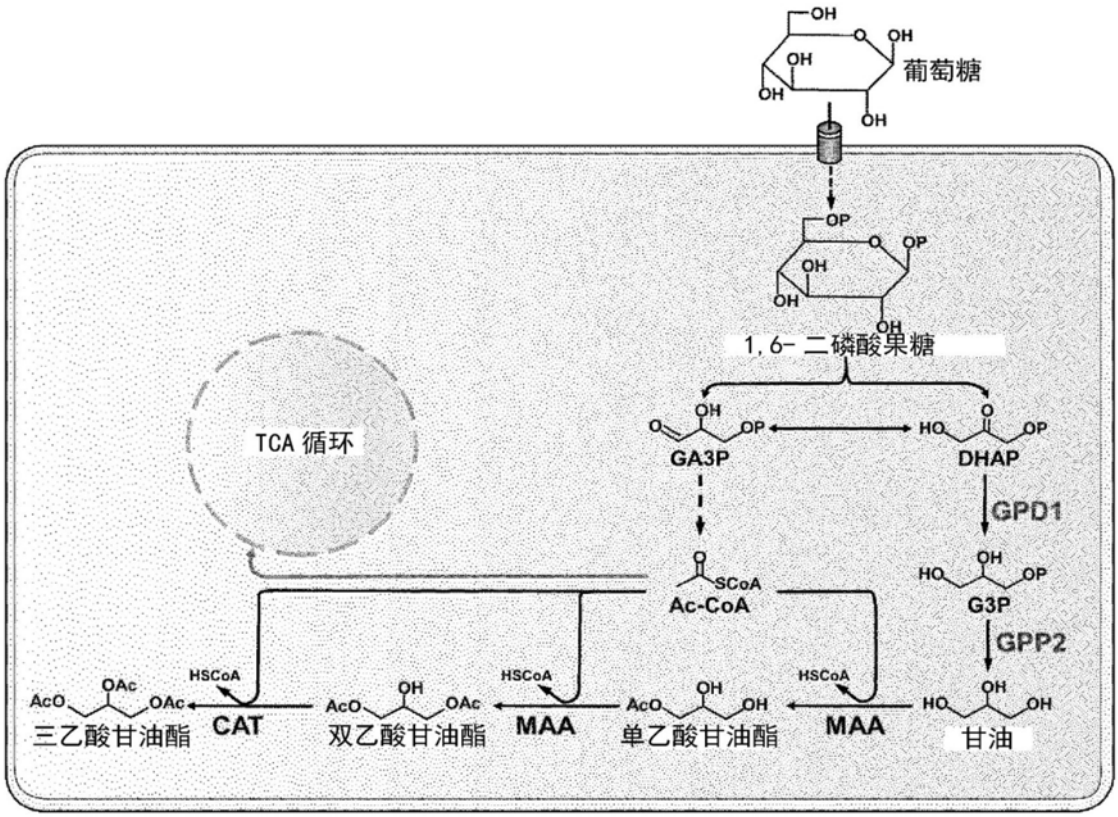

葡萄糖
1,6- 二磷酸果糖
TCA 循环
GA3P
DHAP
GPD1
Ac-CoA
G3P
GPP2
三乙酸甘油酯
CAT
双乙酸甘油酯
MAA
单乙酸甘油酯
MAA
甘油

图2

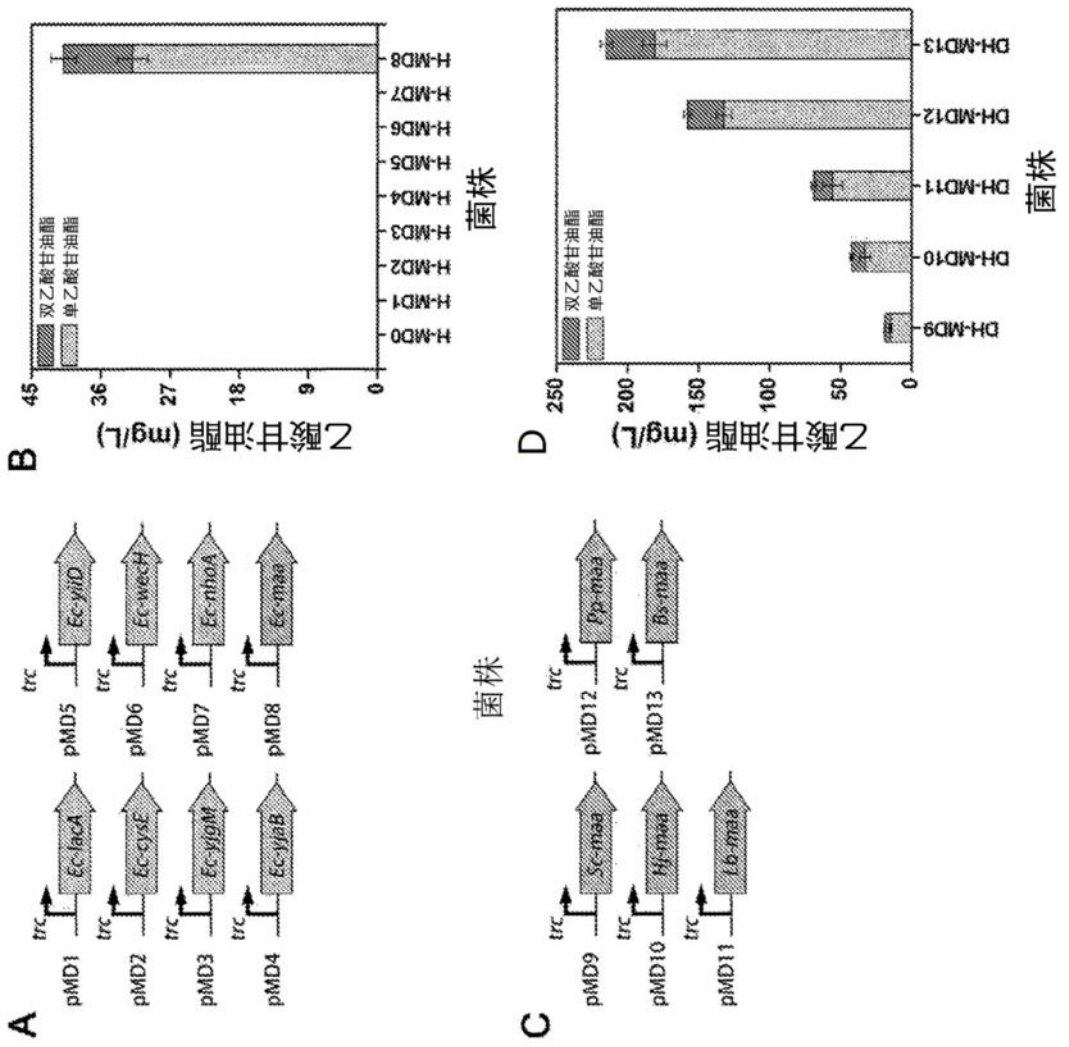

A
pMD1
pMD2
pMD3
pMD4
pMD5
pMD6
pMD7
pMD8
trc
Ec-lacA
Ec-ysiE
Ec-yjgM
Ec-yjaB
Ec-yliD
Ec-wecH
Ec-nhoA
Ec-maa
B
乙酸甘油酯 (mg/L)
菌株
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
H-MD0
H-MD1
H-MD2
H-MD3
H-MD4
H-MD5
H-MD6
H-MD7
H-MD8
C
pMD9
pMD10
pMD11
pMD12
pMD13
Sc-maa
Hj-maa
Lb-maa
Pp-maa
Bs-maa
D
乙酸甘油酯 (mg/L)
菌株
DH-MD9
DH-MD10
DH-MD11
DH-MD12
DH-MD13

图3

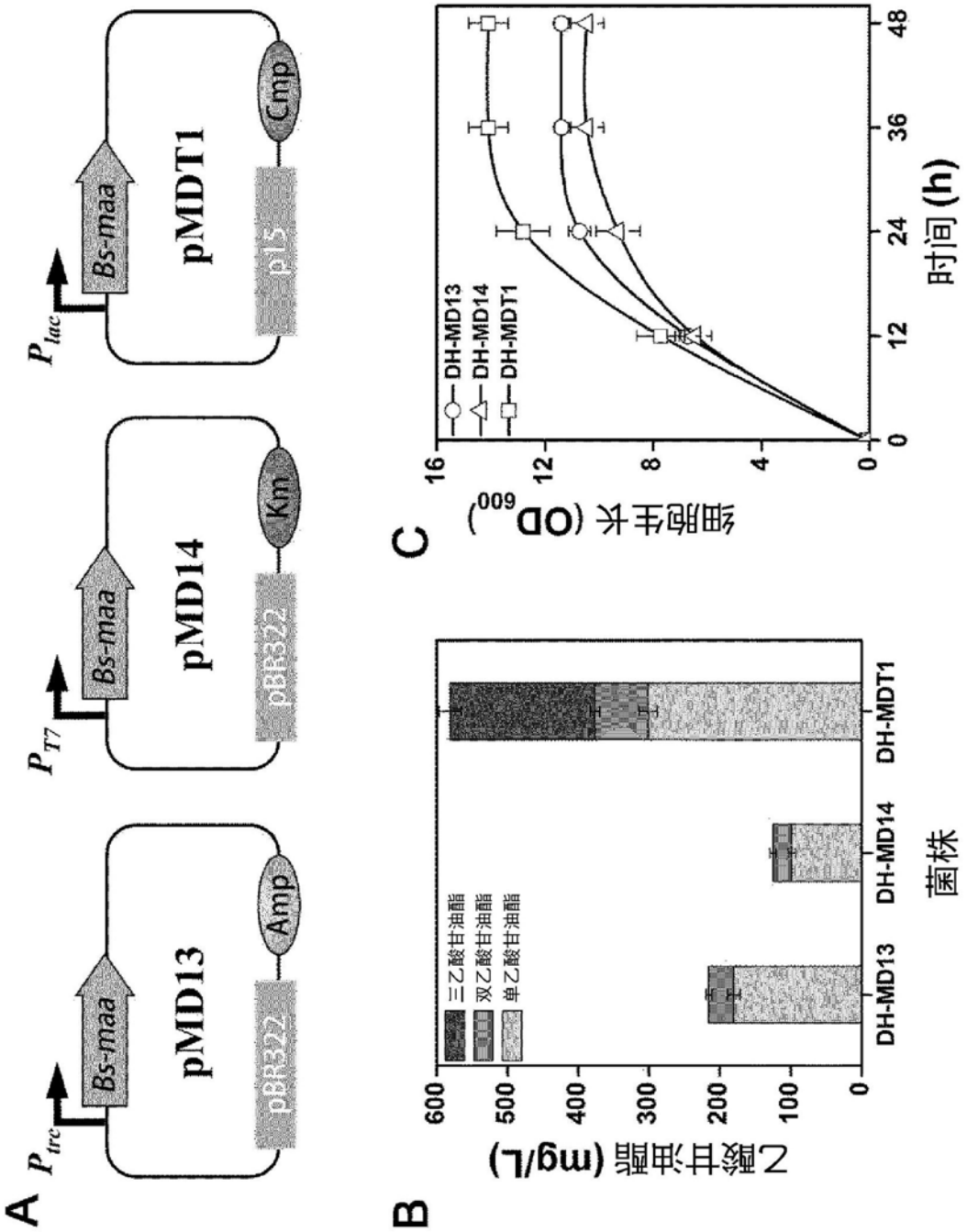

A
P_{trc}
Bs-maa
pMD13
pBBR322
Amp
P_{T7}
Bs-maa
pMD14
pBBR322
Km
P_{lac}
Bs-maa
pMDT1
p15
Cmp
B
乙酸甘油酯 (mg/L)
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
DH-MD13
DH-MD14
DH-MDT1
菌株
C
细胞生长 (OD_{600})
DH-MD13
DH-MD14
DH-MDT1
时间 (h)

图4

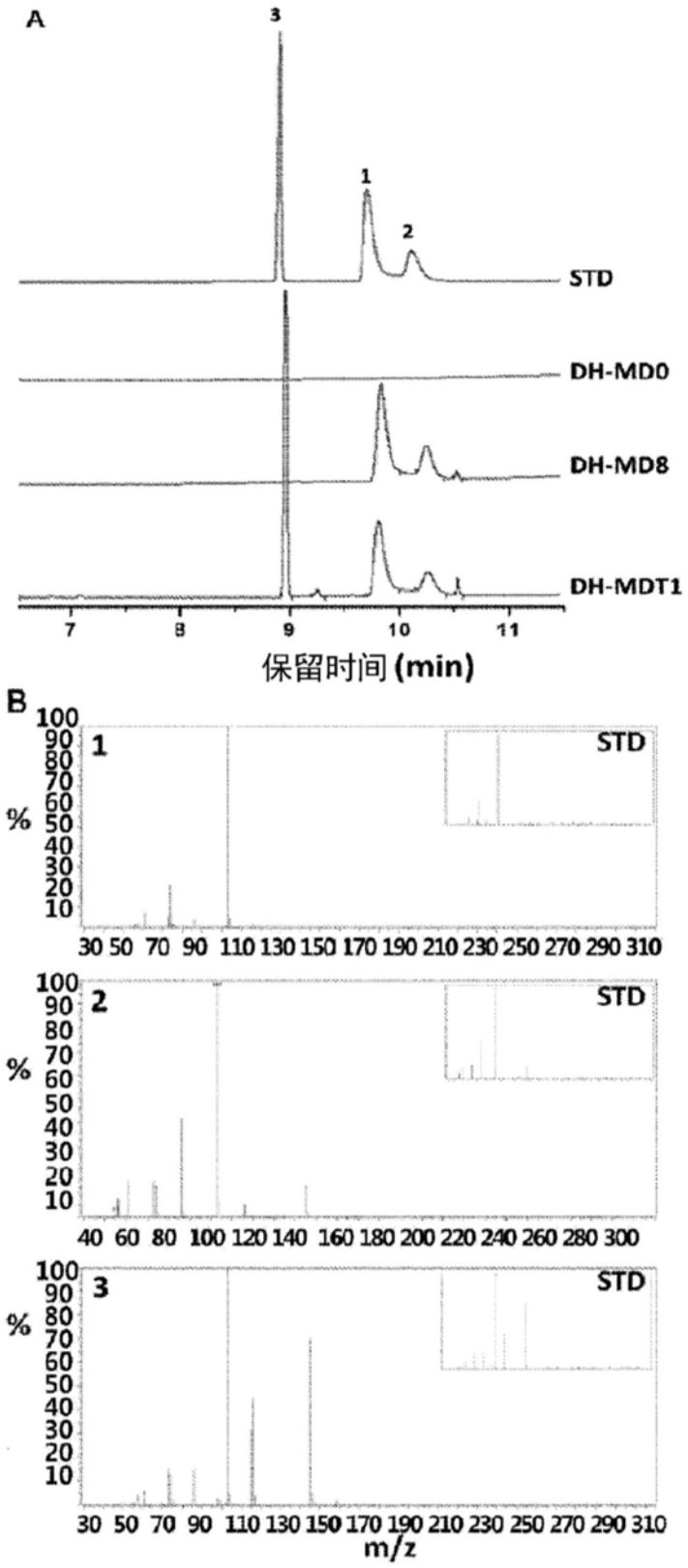

A
3
1
2
STD
DH-MD0
DH-MD8
DH-MDT1
7
8
9
10
11
保留时间 (min)
B
1
STD
2
STD
3
STD
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
30 50 70 90 110 130 150 170 190 210 230 250 270 290 310
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300
m/z

图5

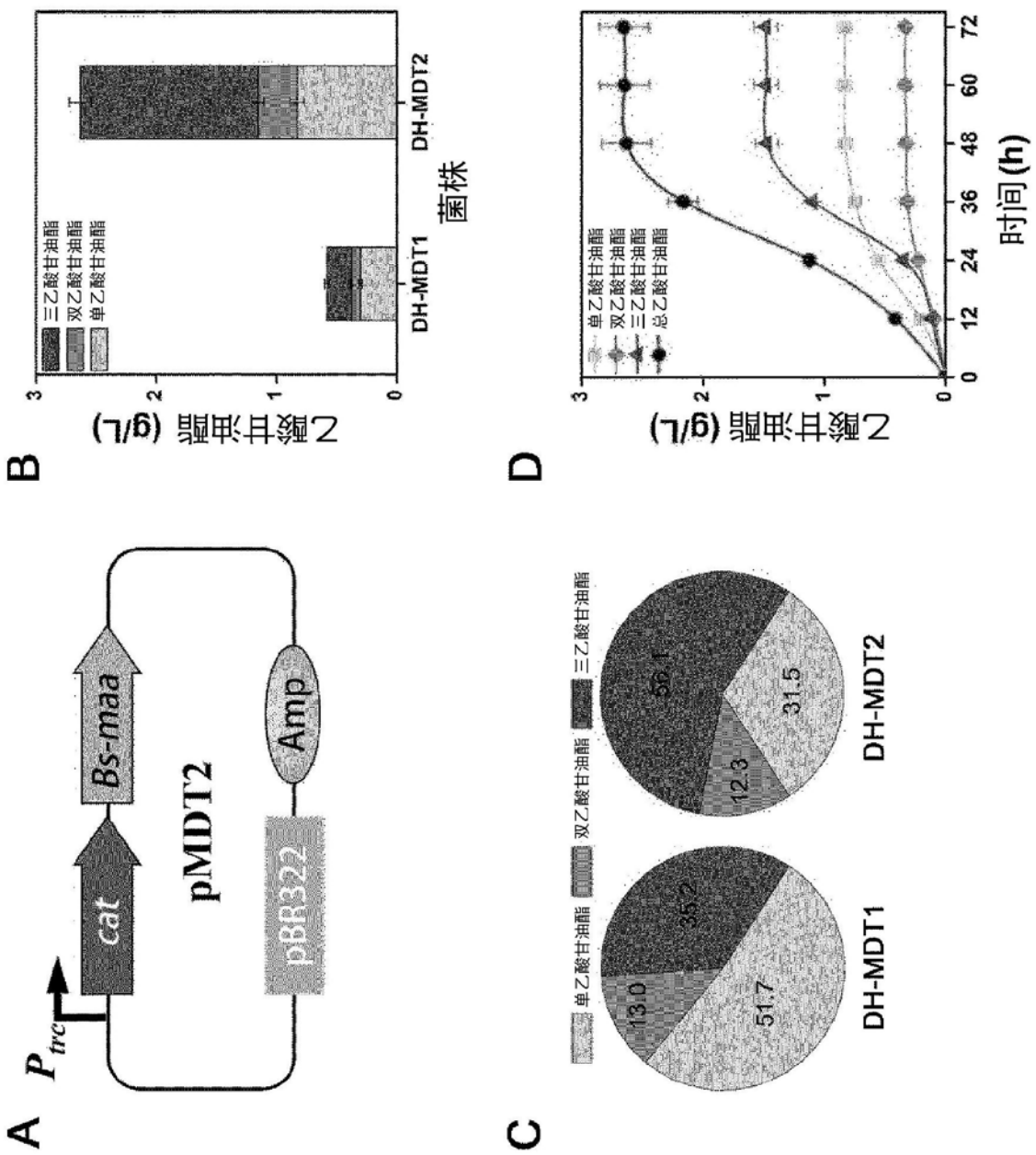

A
P_{trc}
cat
Bs-maa
pMDT2
Amp
pBR322
B
乙酸甘油酯 (g/L)
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
DH-MDT1
DH-MDT2
菌株
C
单乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
三乙酸甘油酯
13.0
35.2
51.7
DH-MDT1
56.1
12.3
31.5
DH-MDT2
D
乙酸甘油酯 (g/L)
单乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
三乙酸甘油酯
总乙酸甘油酯
时间 (h)

图6

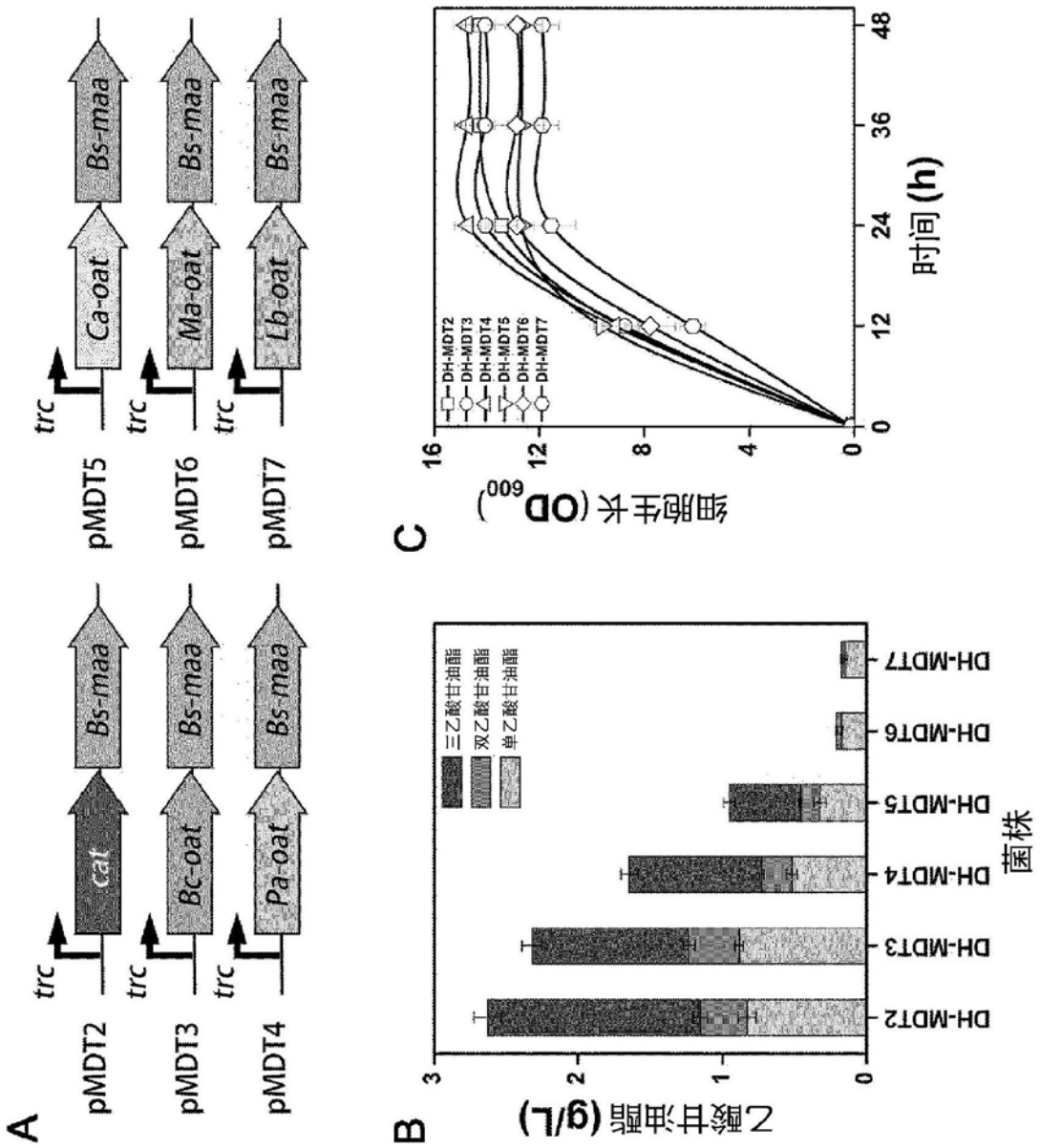

A
pMDT2
pMDT3
pMDT4
pMDT5
pMDT6
pMDT7
trc
cat
Bc-oat
Pa-oat
Ca-oat
Ma-oat
Lb-oat
Bs-maa
B
乙酸甘油酯 (g/L)
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
DH-MDT2
DH-MDT3
DH-MDT4
DH-MDT5
DH-MDT6
DH-MDT7
菌株
C
细胞生长 (OD_{600})
时间 (h)

图7

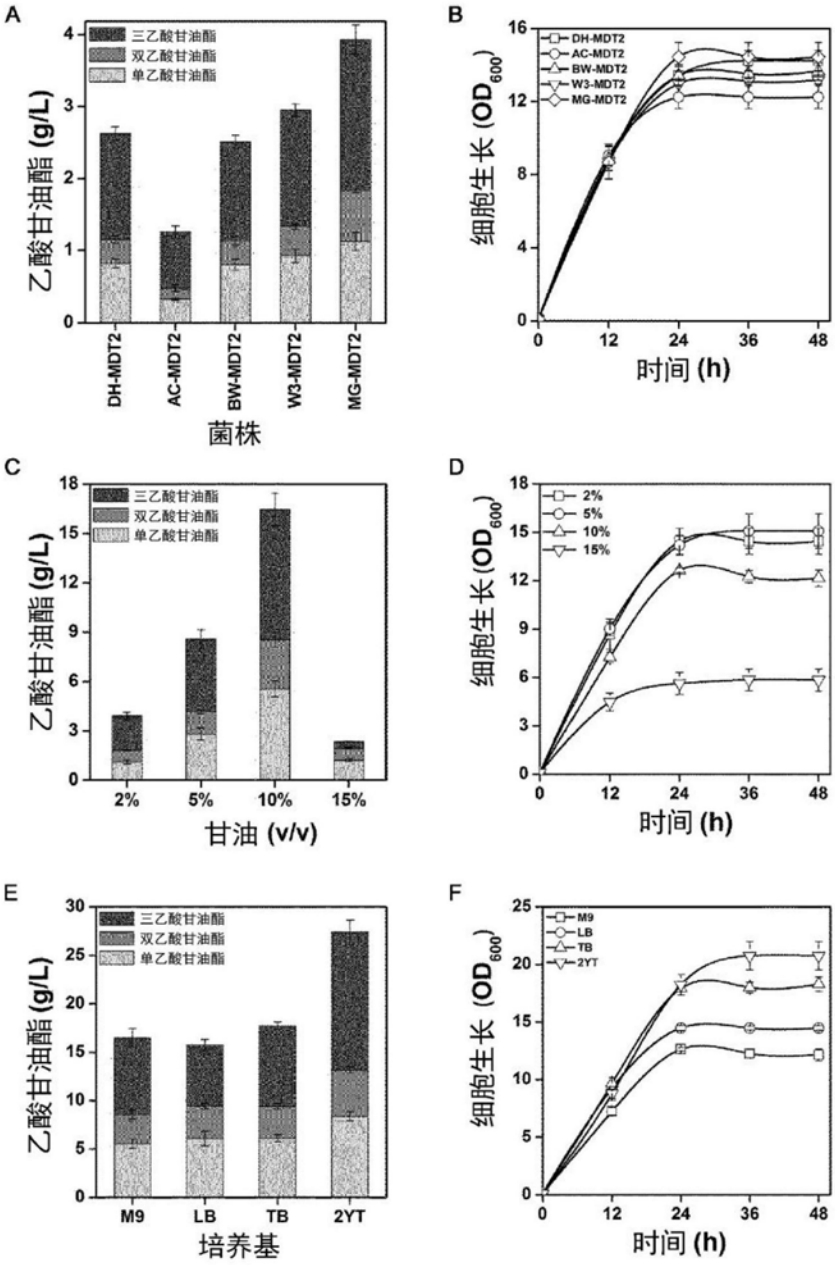

A
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
乙酸甘油酯 (g/L)
DH-MDT2
AC-MDT2
BW-MDT2
W3-MDT2
MG-MDT2
菌株
B
DH-MDT2
AC-MDT2
BW-MDT2
W3-MDT2
MG-MDT2
细胞生长 (OD600)
时间 (h)
C
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
乙酸甘油酯 (g/L)
2%
5%
10%
15%
甘油 (v/v)
D
2%
5%
10%
15%
细胞生长 (OD600)
时间 (h)
E
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
乙酸甘油酯 (g/L)
M9
LB
TB
2YT
培养基
F
M9
LB
TB
2YT
细胞生长 (OD600)
时间 (h)

图8

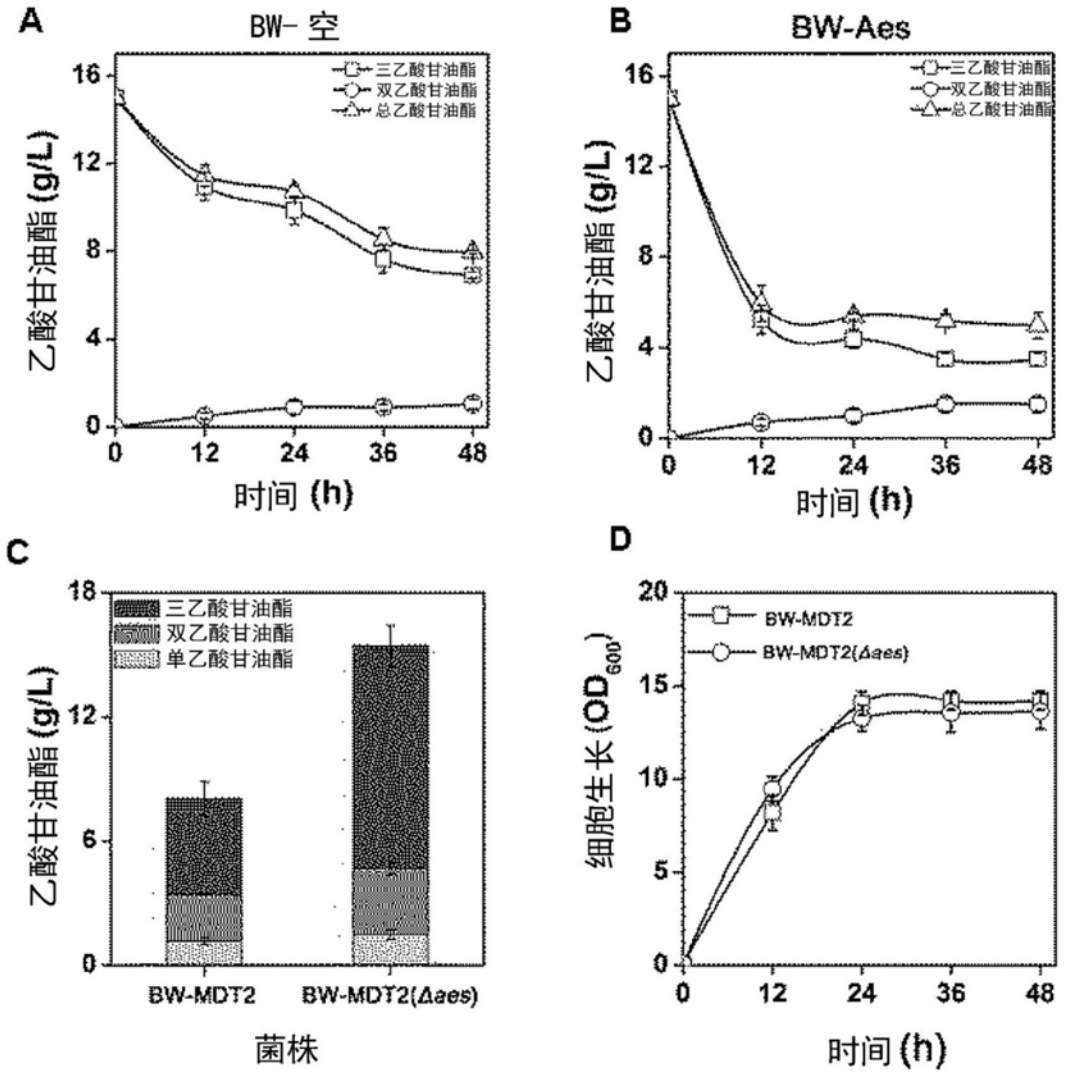

A
BW- 空
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
总乙酸甘油酯
乙酸甘油酯 (g/L)
时间 (h)
B
BW-Aes
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
总乙酸甘油酯
乙酸甘油酯 (g/L)
时间 (h)
C
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
乙酸甘油酯 (g/L)
BW-MDT2
BW-MDT2(Δaes)
菌株
D
BW-MDT2
BW-MDT2(Δaes)
细胞生长 (OD600)
时间 (h)

图9

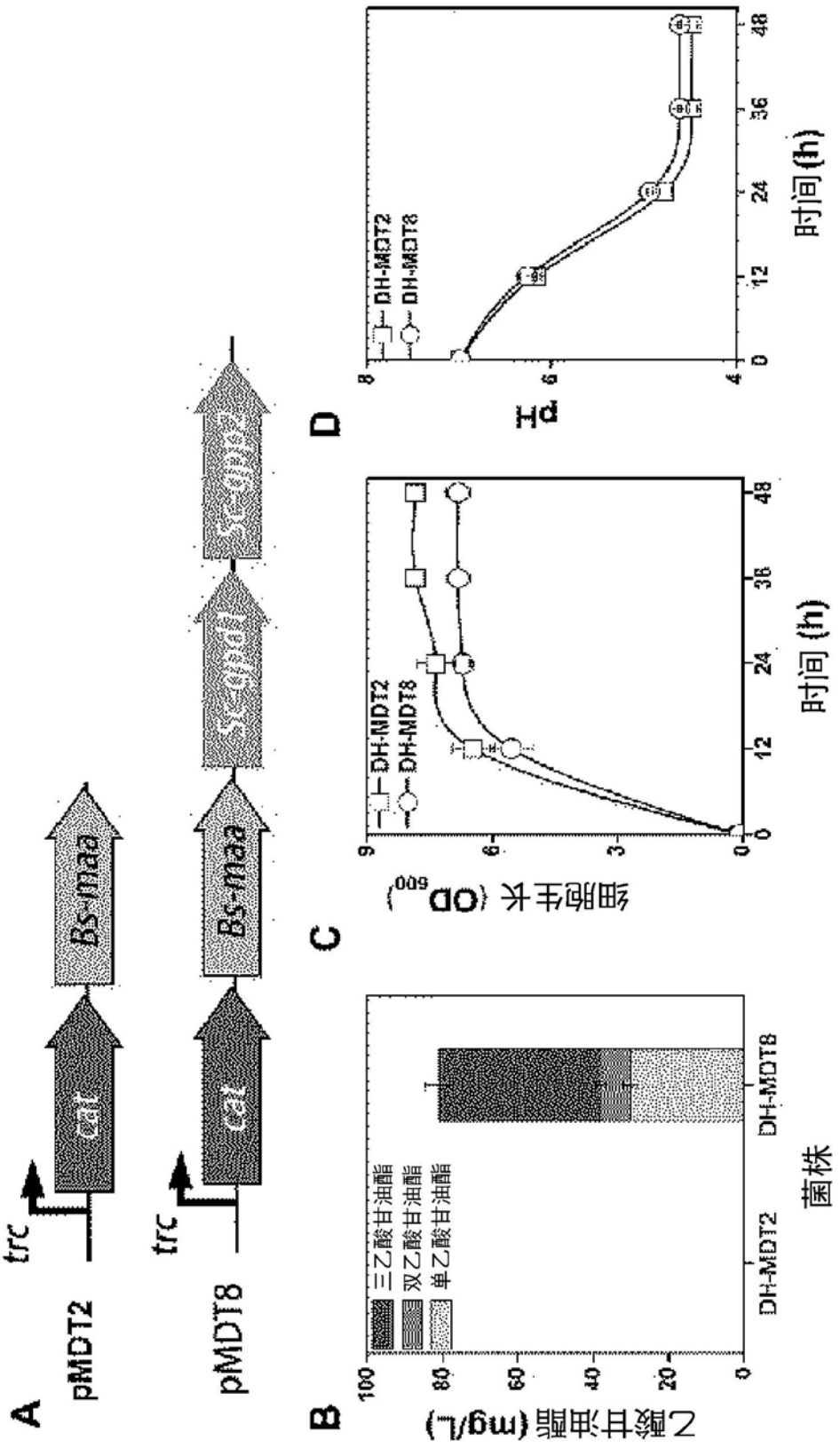

A
pMDT2
trc
cat
Bs-maa
pMDT8
trc
cat
Bs-maa
Sc-dpd1
Sc-dpd2
B
乙酸甘油酯 (mg/L)
三乙酸甘油酯
双乙酸甘油酯
单乙酸甘油酯
DH-MDT2
DH-MDT8
菌株
C
细胞生长 (OD_{600})
DH-MDT2
DH-MDT8
时间 (h)
D
pH
DH-MDT2
DH-MDT8
时间(h)

图10

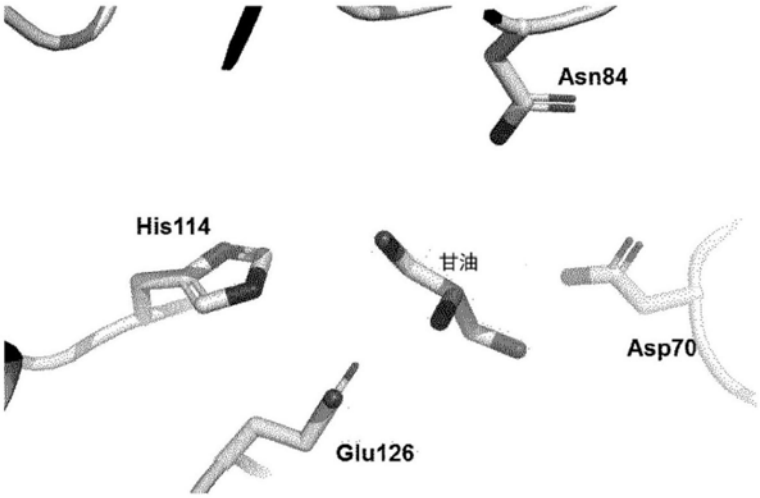

Asn84
His114
甘油
Asp70
Glu126

图11

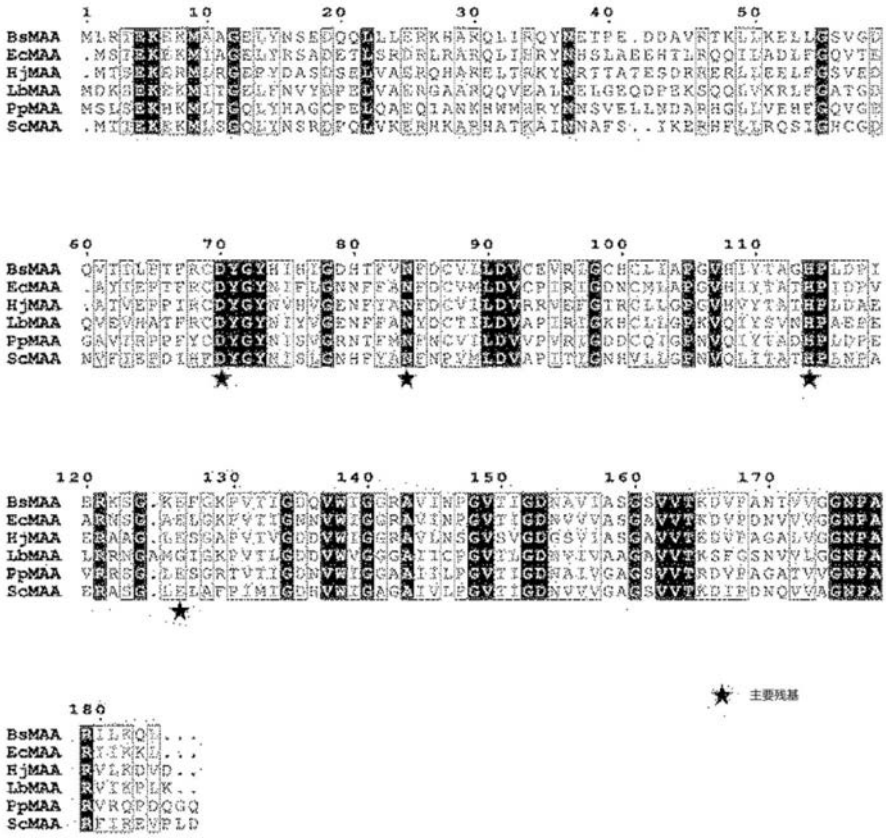

BsMAA
EcMAA
HjMAA
LbMAA
PpMAA
ScMAA
主要残基

图12

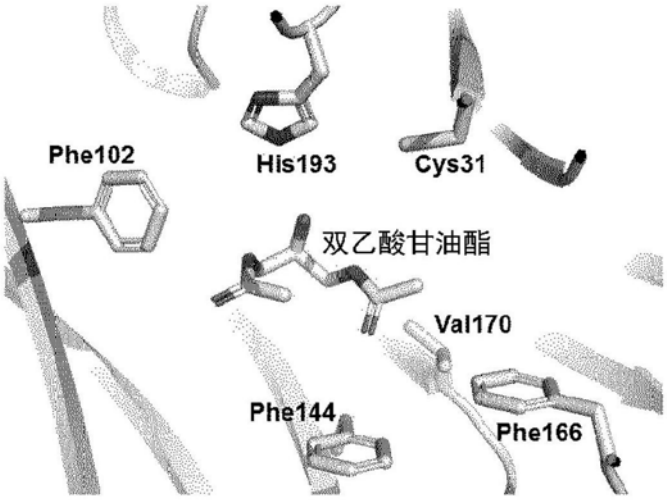

Phe102
His193
Cys31
双乙酸甘油酯
Val170
Phe144
Phe166

图13

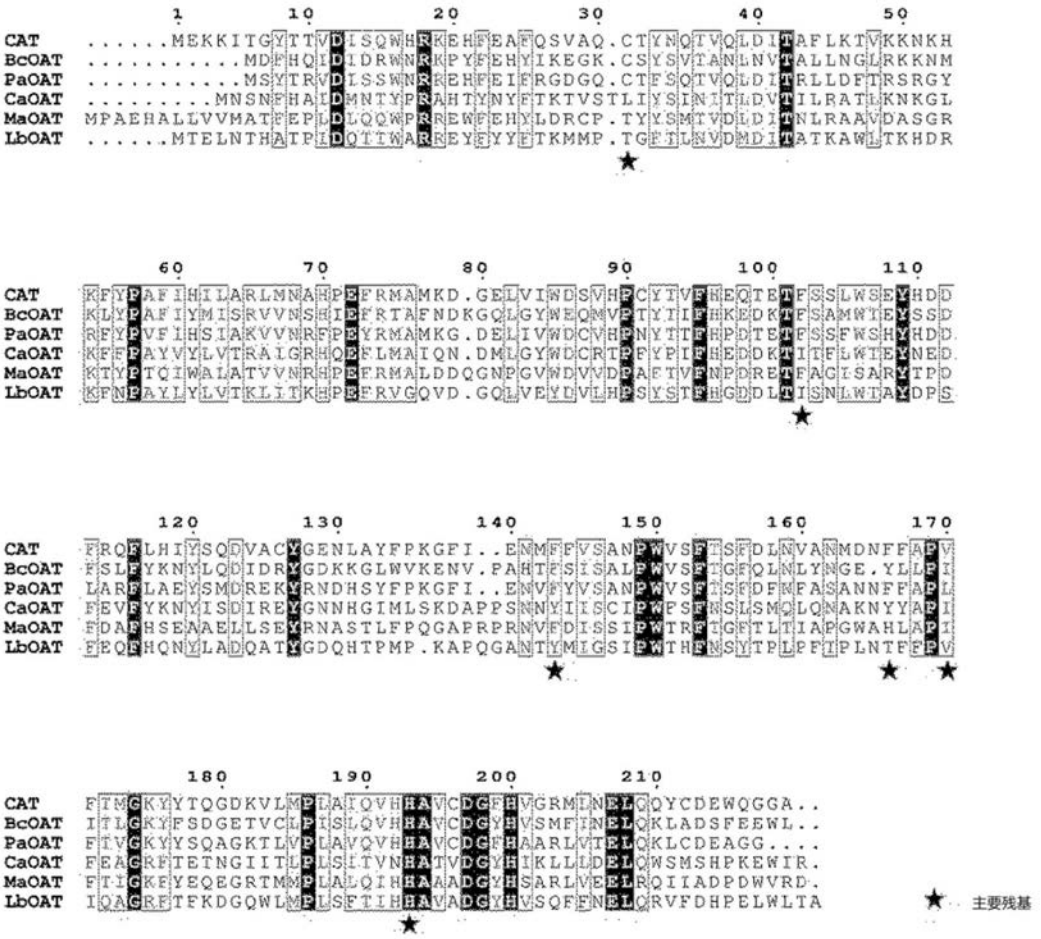

CAT
BcOAT
PaOAT
CaOAT
MaOAT
LbOAT
主要残基

图14