



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113748210 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 10

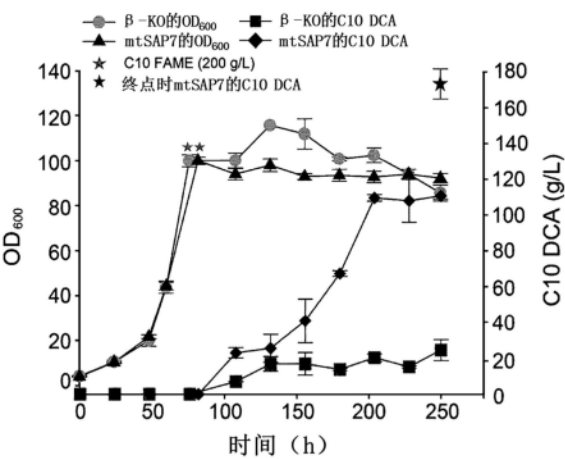
(21) 申请号 201980091207.5	(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
(22) 申请日 2019.12.04	专利代理师 郑元博
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113748210 A	(51) Int.Cl. C12N 15/81 (2006.01) C12N 9/20 (2006.01) C07K 14/40 (2006.01) C12P 7/44 (2006.01)
(43) 申请公布日 2021.12.03	(56) 对比文件 KR 20170048763 Y, 2017.05.10 GenBank.XM_002548456.1.《GenBank》.2018, 第1-2页. GenBank.XM_002548593.1.《GenBank》.2018, 第1-2页. GenBank.XM_002548183.1.《GenBank》.2018, 第1-3页.
(30) 优先权数据 10-2018-0154372 2018.12.04 KR	审查员 许慧娜
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.08.03	权利要求书1页 说明书22页 序列表13页 附图16页
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2019/017044 2019.12.04	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/116941 KO 2020.06.11	
(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团 地址 韩国首尔	
(72) 发明人 金京宪 蒂鲁马莱萨米·巴布 金度亨 李种禾 李定茂 李浩昌 吴星昊 金秀汉 玄淌析	

(54) 发明名称

用于生产二羧酸的微生物及使用其生产二羧酸的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种热带假丝酵母细胞系,其包含突变基因,对基质细胞的细胞毒性具有改善的耐受性,并且涉及一种使用热带假丝酵母细胞系生产二羧酸的方法。与现有细胞系相比,根据本发明开发的生产二羧酸的热带假丝酵母细胞系对现有基质毒性具有改善的耐受性,二羧酸生产效率显著提高,因此可用于二羧酸的生物生产,并且预期具有高的工业实用性。



1. 对底物的细胞毒性具有改善的耐受性的热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 菌株, 其中所述菌株包含一个或多个突变的基因, 所述一个或多个突变的基因选自由SEQ ID NO:4所示的碱基序列表示的突变的LIP1基因、由SEQ ID NO:5所示的碱基序列表示的突变的FAT1基因以及由SEQ ID NO:6所示的碱基序列表示的突变的MRP1基因。

2. 根据权利要求1所述的热带假丝酵母菌株, 其中, 所述热带假丝酵母菌株具有阻断的 β -氧化途径。

3. 根据权利要求1所述的热带假丝酵母菌株, 其中, 所述底物是脂肪酸甲酯 (FAME)。

4. 根据权利要求3所述的热带假丝酵母菌株, 其中, 所述脂肪酸甲酯底物包括选自C₆-C₂₀脂肪酸甲酯中的一种或多种。

5. 一种用于生产二羧酸 (DCA) 的方法, 所述方法包括:

将权利要求1所述的热带假丝酵母菌株与底物一起在培养基中培养。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 所述底物是脂肪酸甲酯 (FAME)。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中, 所述脂肪酸甲酯包括选自C₆-C₂₀脂肪酸甲酯中的一种或多种。

用于生产二羧酸的微生物及使用其生产二羧酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包括突变基因的对底物的细胞毒性具有改善的耐受性的微生物,以及使用该微生物生产二羧酸(DCA)的方法。

背景技术

[0002] 二羧酸(Dicarboxylic acid,DCA)是含有两个羧基基团(-COOH)的有机化合物。二羧酸的分子通式可以用 $\text{HO}_2\text{C}-\text{R}-\text{CO}_2\text{H}$ 来表示,其中R可以是脂肪族或芳香族基团。通常,二羧酸表现出类似于单羧酸的化学反应和反应性。二羧酸也用于制备共聚物,例如聚酰胺和聚酯。工业中使用最广泛的二羧酸是己二酸,它是用于生产尼龙的前体。二羧酸的其他例子包括天冬氨酸和谷氨酸,它们是人体中的两种氨基酸。此外,其他羧酸已用于各种工业领域。

[0003] 此类二羧酸已通过化学工艺或生物方法制备。作为关于制备二羧酸的一个例子,作为二羧酸之一的癸二酸,即使使用苯酚和甲酚也可以合成它,但已知蓖麻油氧化是最环保且价格最具竞争力的方法。蓖麻油通过蒸汽裂解进行酯交换,并通过酯交换生产蓖麻油酸。将如此产生的蓖麻油酸在 250°C 下加热后与碱(例如熔融苛性钠等)混合,经苛性碱消化分解为辛醇(2-辛醇)和癸二酸。将如此产生的产物纯化以得到高纯度癸二酸(美国专利第5,952,517和6,392,074号)。然而,这种方法的缺点是需要 300°C 或更高的高温处理下才能达到上述目的,并且使用诸如硫酸的强酸,以及由于使用了诸如重金属、有毒有机溶剂等物质而产生大量的环境污染物。除了使用化学方法制备癸二酸外,还可以通过电解己二酸单乙酯钾(Potassium monoethyl adipate)来进行这种生产。

[0004] 在之前的研究中,已经报道了使用 ω -氧化能力优异且 β -氧化被阻断的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)菌株通过生物方式来生产二羧酸。然而,该方法的局限性在于它不能有效地产生二羧酸,因为热带假丝酵母菌株对表现出细胞毒性的底物的耐受性差(非专利文件1:David L.Craft等人,《应用与环境微生物学》,69(10):5983-5991,2003)。特别是,韩国专利(专利申请号10-2015-0149253)公开了使用一种突变型热带假丝酵母菌株由具有细胞毒性的底物生产癸二酸,但没有关于耐受性增强因子和癸二酸产生途径的研究的报道。因此,开发能够使用生物方法大量生产二羧酸的有用菌株是重要的。

[0005] 因此,本发明人通过使用产生二羧酸的热带假丝酵母菌株的进化方法筛选了对具有细胞毒性的底物具有增强的耐受性以表现出增强的产生二羧酸的能力的菌株,并鉴定了来自热带假丝酵母菌株的对底物耐受性有影响的基因。因此,基于这些事实完成了本发明。

[0006] [相关技术文件]

[0007] [专利文件]

[0008] 韩国专利公开特许号10-2017-0048763

[0009] [非专利文件]

[0010] David L.Craft等人,《应用与环境微生物学》,69(10):5983-5991,2003

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 因此,本发明的一个目的是提供一种对底物的细胞毒性具有改善的耐受性的热带假丝酵母菌株,其中该菌株包含在一个或多个选自以下的基因中的突变:由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因、由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因以及由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因,或其中该菌株用一个或多个选自以下的突变基因转化:突变的LIP1基因、突变的FAT1基因和突变的MRP1基因。

[0013] 本发明的另一个方面是提供一种通过将热带假丝酵母菌株与底物一起培养来生产二羧酸的方法。

[0014] 技术方案

[0015] 为了实现以上目的,本发明提供一种对底物的细胞毒性具有改善的耐受性的热带假丝酵母菌株,其中该菌株包含在一个或多个选自以下的基因中的突变:由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因、由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因以及由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因,或其中该菌株用一个或多个选自以下的突变基因转化:突变的LIP1基因、突变的FAT1基因和突变的MRP1基因。

[0016] 根据一个实施方式,当将正常的热带假丝酵母菌株在含有表现出细胞毒性的底物的培养基中培养以筛选在进化方面在该底物上具有优异存活能力的菌株时,已经通过对所筛选菌株的基因组分析发现,一个或多个选自以下的内源基因发生突变:由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因、由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因以及由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因。此外,已经发现,当突变基因被分离并单独转导到正常的热带假丝酵母菌株中时,该热带假丝酵母菌株对表现出细胞毒性的底物具有改善的耐受性。

[0017] 由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因的突变基因mtLIP1(脂肪酶)的碱基序列可以如SEQ ID NO:4所示,由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因的突变基因mtFAT1(脂肪酸转运)的碱基序列可以如SEQ ID NO:5所示,或者由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因的突变基因mtMRP1(多药耐药蛋白)的碱基序列可以如SEQ ID NO:6所示。

[0018] 一个或多个突变基因可以被包括在载体中。载体可以是基因可以可操作连接的形式。在本发明中,术语“可操作连接”一般意指将碱基表达调控序列与编码所需蛋白质的碱基序列可操作连接以执行其功能,从而对编码所需蛋白质的碱基序列的表达产生影响。可以使用本领域已知的基因重组技术来实现载体的可操作连接,并且可以使用本领域已知的消化酶和连接酶等进行位点特异性DNA消化和连接。

[0019] 在本发明中,术语“载体”是指任何用于将碱基克隆和/或转移到宿主细胞中的介质。载体可以是与另一个DNA片段结合以复制结合片段的复制子。术语“复制子”是指任何在体内作为DNA复制的自体单位起作用、也就是说可通过其自身调节进行复制的遗传单位(例如,质粒、噬菌体、粘粒、染色体、病毒)。术语“载体”可以包括用于在体外、离体或体内将碱基引入宿主细胞的病毒介质和非病毒介质。此外,术语“载体”可以包括微球形DNA。例

如,载体可以是不具有细菌DNA序列的质粒。术语“载体”还可以包括转座子,例如Sleeping Beauty (Izsvak等人,J.Mol.Biol.302:93-102(2000)),或人工染色体。常用载体的例子包括天然存在的或重组的质粒、粘粒、病毒和噬菌体。例如,pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、Charon21A等可以用作噬菌体载体或粘粒载体。也可以使用质粒载体。本发明中可以使用的载体没有特别限制,可以使用公知的表达载体。

[0020] 热带假丝酵母菌株可以表达突变基因,或者可以包括含有突变基因的载体。

[0021] 热带假丝酵母菌株是一种 β -氧化途径被阻断的菌株。特别地,热带假丝酵母菌株可以是 β -氧化途径被阻断从而使用底物产生二羧酸的菌株。

[0022] 底物可以是脂肪酸甲酯(Fatty acid methyl ester,FAME)。在这种情况下,底物对产生二羧酸的热带假丝酵母菌株表现出细胞毒性。特别地,脂肪酸甲酯可以是包括 C_6 - C_{20} 亚烷基基团的脂肪酸甲酯中的一种。更特别地,脂肪酸甲酯可以是癸酸甲酯(Decanoic acid methyl ester,DAME)。

[0023] 根据本发明的一个实施方式,证实了以下热带假丝酵母菌株对脂肪酸甲酯的细胞毒性具有改善的耐受性,从而表现出在底物中优异的存活能力:其中一个或多个选自由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因、由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因以及由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因的基因发生突变的热带假丝酵母菌株,或其中引入了一个或多个突变基因的热带假丝酵母菌株。

[0024] 根据另一方面,本发明提供了一种生产二羧酸(DCA)的方法,该方法包括将对底物的细胞毒性具有改善的耐受性的热带假丝酵母菌株与底物一起培养,在该热带假丝酵母菌株中,一个或多个选自由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因、由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因以及由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因的基因发生突变,或在该热带假丝酵母菌株中,引入了一个或多个突变基因。

[0025] 由于根据本发明的用于生产二元羧酸的方法实际上使用上述热带假丝酵母菌株,因此省略了两两者之间共同内容的描述,以免本说明书过于复杂。

[0026] 热带假丝酵母菌株可以是 β -氧化途径被阻断的菌株。

[0027] 热带假丝酵母菌株的二羧酸生产所需的底物可以是脂肪酸甲酯(FAME)。在这种情况下,底物对产生二羧酸的热带假丝酵母菌株表现出细胞毒性。特别地,脂肪酸甲酯可以是包括 C_6 - C_{20} 烷基链的脂肪酸甲酯中的一种。

[0028] 根据本发明的一个实施方式,制备了突变菌株并将该突变菌株用于生产二羧酸的实验,该突变菌株通过将一种或多种选自以下的基因引入 β -氧化途径被阻断的热带假丝酵母菌株中而获得:由SEQ ID NO:1所示的碱基序列表示的LIP1(脂肪酶)基因的突变基因mtLIP1(脂肪酶)、由SEQ ID NO:2所示的碱基序列表示的FAT1(脂肪酸转运)基因的突变基因FAT1(脂肪酸转运),以及由SEQ ID NO:3所示的碱基序列表示的MRP1(多药耐药蛋白)基因的突变基因mtMRP1(多药耐药蛋白)。对突变型热带假丝酵母菌株和 β 氧化途径被阻断的热带假丝酵母菌株的二羧酸生产能力进行了比较。结果证实,本发明的突变型热带假丝酵母菌株具有优异的二羧酸生产能力,这表明热带假丝酵母菌株对底物的细胞毒性的耐受性通过所公开基因的突变得到了改善,这导致菌株生存力提高。

[0029] 有益效果

[0030] 与现有菌株相比,根据本发明开发的用于生产二羧酸的热带假丝酵母菌株具有对现有毒性底物的改善的耐受性以及显著提高的二羧酸生产效率,因此预期具有高的工业实用性,因为热带假丝酵母菌株适用于生产二羧酸的生物过程。

附图说明

[0031] 图1示出了比较癩酸甲酯(DAME)、癩酸(Decanoic acid, DA)和癩二酸(Sebacic acid, SA)对热带假丝酵母菌株的细胞毒性的结果;

[0032] 图2示出了根据以下代时的突变型热带假丝酵母菌株的生长图:E1(170代时)、E2(470代时)、E4(700代时)、E5(720代时)以及ES5;

[0033] 图3示出了突变型热带假丝酵母菌株(WT、E5和ES5)中每一种的干细胞重量(Dry cell weight, DCW)的测量结果;

[0034] 图4示出了突变型热带假丝酵母菌株(WT、E5和ES5)中每一种的培养基中DAME消耗量的分析结果;

[0035] 图5示出了突变型热带假丝酵母菌株(WT、E5和ES5)中每一种的癩二酸产量的分析结果;

[0036] 图6至图8示出了对引入了mtLIP1基因的突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP1)、作为亲本菌株的 β -氧化途径缺失的菌株(β -K0)、以及引入了LIP1基因的菌株(SAP1)的干细胞重量(图6)、DAME消耗量(图7)、以及癩二酸产量(图8)进行比较和分析的结果;

[0037] 图9至图11示出了对引入了mtFAT1基因的突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP2)、作为亲本菌株的 β -氧化途径缺失的菌株(β -K0)、以及引入了FAT1基因的菌株(SAP2)的干细胞重量(图9)、DAME消耗量(图10)、以及癩二酸产量(图11)进行比较和分析的结果;

[0038] 图12至图14示出了对引入了mtMRP1基因的突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP3)、作为亲本菌株的 β -氧化途径缺失的菌株(β -K0)、以及引入了MRP1基因的菌株(SAP3)的干细胞重量(图12)、DAME消耗量(图13)、以及癩二酸产量(图14)进行比较和分析的结果;

[0039] 图15为用于转导热带假丝酵母的质粒载体示意图,该质粒载体包含mtLIP1基因、mtFAT1基因和mtMRP1基因;

[0040] 图16至图18示出了引入了mtLIP1基因、mtFAT1基因和mtMRP1基因中两个或更多个基因的突变型热带假丝酵母菌株的干细胞重量(图16)、DAME消耗量(图17)、以及癩二酸产量(图18)的分析结果;

[0041] 图19示出了通过测量引入了mtLIP1基因、mtFAT1基因和mtMRP1基因的突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP7)和亲本菌株(β -K0)的干细胞重量和二羧酸产量来确认突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP7)和亲本菌株(β -K0)对C₁₀脂肪酸甲酯(FAME)底物的细胞毒性耐受性的结果;

[0042] 图20示出了通过测量引入了mtLIP1基因、mtFAT1基因和mtMRP1基因的突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP7)和亲本菌株(β -K0)的干细胞重量和二羧酸产量来确认突变型热带假丝酵母菌株(mtSAP7)和亲本菌株(β -K0)对C₈至C₁₂脂肪酸甲酯(FAME)底物的细胞毒性耐受性的结果。

具体实施方式

[0043] 下面结合本发明的实施方式对本发明的构成和效果进行更详细的说明。但是,应当理解,本文所描述的实施方式仅用于举例说明本发明,并不意在限制本发明的范围。

[0044] [实施例1]确认底物和产物的生物细胞毒性

[0045] 为了确认用作生产癸二酸的底物的癸酸甲酯(DAME)及其产物(即,癸二酸)的细胞毒性,在以下条件下进行毒性试验。更具体地,将在相关领域中用于生产癸二酸的热带假丝酵母MYA_3404菌株在YNB培养基(10g/L酵母提取物和20g/L蛋白胨)中培养,该培养基中以5g/L的浓度添加了DAME、DA或癸二酸。培养温度为30℃,使菌株在200rpm下培养36小时。

[0046] 结果,如图1所示,证实了与没有添加DAME、DA和癸二酸的对照相比,该菌株在添加了DAME、DA或癸二酸的培养基中生长速率较慢或不生长。更具体地,证实了与对照相比,在添加了癸二酸的培养基中菌株的生长速率和总细胞量降低,并且证实了菌株在添加了5g/L浓度的DAME或DA的培养基中不生长。根据结果,确认了所有底物(DAME和DA)和产物(癸二酸)都具有细胞毒性。其中,证实了DAME与癸二酸相比具有更强的细胞毒性。从上述结果确认,为了生产高浓度的癸二酸,优先需要开发对作为底物的DAME具有耐受性的菌株。

[0047] [实施例2]使用进化工程方法开发耐DAME菌株

[0048] 为了开发对具有细胞毒性的底物的DAME具有耐受性的菌株,将热带假丝酵母(*C. tropicalis*)MYA_3404菌株在添加了10g/L浓度的DAME的YNB培养基(10g/L酵母提取物和20g/L蛋白胨)中培养。在这种情况下,证实了由于DAME底物的低溶解度,培养基中DAME的浓度保持在大约0.45g/L(最大溶解度)(通过内部实验的结果证实)。接种菌株的生长曲线通过测量600nm波长处的吸光度值来确定。

[0049] 实时观察接种了菌株的培养基的吸光度,然后将菌株在新鲜培养基中传代培养,直至菌株生长达到中期指数期。由测得的吸光度值计算出比生长速率,将比生长速率变化很大的阶段的菌株分别确定为E1(170代时)、E2(470代时)、E4(700代时)和E5(720代时)。此外,将通过上述方法获得的E5菌株在补充有20g/L葡萄糖作为无毒碳源的YNB培养基(10g/L酵母提取物和20g/L蛋白胨)中进行传代培养,然后在DAME底物中重新接种以筛选即使在更换碳源后仍保持对DAME的耐受性的菌株,将该菌株命名为“ES5”。

[0050] 测定了突变菌株的生长曲线。结果证实,突变菌株的比生长速率随着传代培养的进行而增加,如图2所示。证实了,ES5菌株在不失去其耐受性的情况下也表现出高的比生长速率,并且对DAME底物具有恒定的耐受性。为了更具体地确定比生长速率和对DAME底物的耐受性,将作为对照的WT菌株和作为突变菌株的E5和ES5菌株在添加了10g/L浓度的DAME的YNB培养基中培养。培养温度为30℃,培养时间为120小时,每12小时或每24小时收集一次样品,以测量样品的干细胞重量(DCW)。

[0051] 测量每种菌株的干细胞重量(DCW)。结果,如图3所示,证实了WT菌株具有非常低的DCW值(没有生长),而E5和ES5菌株在菌株培养120小时后具有最大细胞量,以及ES5和E5菌株的细胞量分别增长至2.5g/L和2.2g/L。基于结果证实了,通过进化工程方法获得的突变菌株E5和ES5对DAME底物具有耐受性,从而得到更大程度的生长。

[0052] [实施例3]确认亲本菌株(WT)和突变菌株(E5和ES5)的表型变化

[0053] 将实施例2中获得的突变菌株E5和ES5的DAME底物实际消耗量以及癸二酸生产量与亲本菌株(WT)进行比较。为了确定DAME底物消耗和癸二酸生产力,将WT、E5和ES5菌株中

的每种在添加了10g/L浓度的DAME的YNB培养基中于30℃温度培养120小时。

[0054] 每12小时或每24小时收集一次用于分析的样品,使用气相色谱/质谱 (Gas chromatography/Mass spectrometry, GC/MS) 来分析培养基中的DAME和癸二酸的浓度。GC/MS条件列于下表1。

[0055] [表1]

[0056]	参数	条件
	载气	氦气
	炉温	100℃进行 3.5min 15℃时 80℃-160℃, °C/min 保持 20min 15℃时 160℃-200℃, °C/min 保持 15min 20℃时 200℃-280℃, °C/min 保持 5min
	进样器温度	250℃
	分流比	01:09.6
	注射体积	1μl
	电子撞击	70eV
	扫描范围	50m/z-600m/z
	界面温度	280℃
	柱	DB-5MS 毛细管柱 (30m×25mm, 0.25μm 膜厚度)
	离子源温度	230℃

[0057] 用于分析DAME的GC/MS分析样品制备如下。将4mL收集的培养液与1mL 10M的HCL混合,并涡旋一分钟。将等量的己烷添加到混合物中,并在室温下孵育10分钟。10分钟后,通过涡旋使混合物充分混合,然后以12000rpm离心1分钟。从分离成两层的混合溶液中收集上清液(己烷),用于GC/MS分析。与之前对收集的样品进行DAME分析一样,将10M HCL添加到用于分析癸二酸的样品中,然后混合。之后,向其中添加等量的乙酸乙酯并混合。然后,收集乙酸乙酯层,并使用真空蒸发器完全干燥。随后,将50μL吡啶(Sigma-Aldrich, StLouis, MO, USA)添加到浓度为2% (w/v) 的O-甲基羟胺盐酸盐(Sigma-Aldrich, StLouis, MO, USA)中,然后在75℃进行甲肟化30分钟。然后,向其中添加80μL的N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(Sigma-Aldrich, StLouis, MO, USA),然后在40℃进行衍生化30分钟。为了量化分析结果,购买了DAME和癸二酸(Sigma-Aldrich, StLouis, MO, USA),并按一定比例稀释。然后,以与上述相同的方式制备用于分析的样品,然后通过GC/MS进行分析。通过GC/MS分析收集的样品以测量培养基的DAME的量。结果,如图4所示,证实了在接种了亲本菌株的培养基中,DAME的量没有大幅减少,而在接种了E5和ES5菌株的培养基中,底物的量急剧减少。因此,证实了在菌株达到最大细胞质量时的120小时后,在接种了E5菌株的培养基中DAME以约3.1g/L存在,以及在接种了ES5菌株的培养基中DAME以约2.8g/L存在。此外,E5和ES5菌株的癸二酸产量(图5)与亲本菌株的癸二酸产量有很大不同。在这种情况下,证实了发酵48小时后的亲本菌株的癸二酸产量约为44.3mg/L,而E5菌株和ES5菌株的癸二酸产量分别为约177.4g/L和约

218.4mg/L。因此,判断E5和ES5菌株表现出高的DAME底物消耗和癸二酸生产力的事实是由于当菌株与具有生物毒性的底物DAME进行传代培养时菌株中的突变。因此,对表现出最高的DAME消耗和癸二酸生产力的ES5菌株进行了碱基测序和转录组分析。

[0058] [实施例4]DAME耐受突变株(ES5)的转录组分析

[0059] 为了考察含有和不含DAME的培养基中转录组的变化,对在补充有DAME的培养基中生长的ES5菌株和在不含DAME的培养基中生长的ES5菌株的转录组进行了分析。

[0060] 将ES5菌株在不含DAME的YNB培养基和补充有10g/L DAME的YNB培养基中于30℃培养24小时。收集培养的细胞,并用水洗涤。之后,将收集的细胞用作用于全RNA提取的样品。使用RNeasy Mini Kit(Qiagen,Hilden,Germany)进行RNA提取,并分别使用NanoDrop(Thermo Scientific,Wilmington,DE,USA)和Agilent Bioanalyzer 2100(Santa Clara, Ca,USA)来测量提取的RNA的浓度和纯度。

[0061] 对突变型ES5菌株的转录组进行分析,并与亲本菌株的转录组进行比较。结果证实,与亲本菌株相比,在ES5菌株中总共有453个基因上调,并且与亲本菌株相比,ES5菌株中有147个基因下调。表2中详述了基因的数量和聚类的详细信息。

[0062] [表2]

[0063] 亲本菌株和DAME耐受突变株(ES5)的转录组的比较/分析结果

[0064]

编号	途径	下调基因数量	下调基因数量
1	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	12	
2	α -亚麻酸代谢	9	
3	精氨酸和脯氨酸代谢	12	
4	精氨酸生物合成	9	
5	抗坏血酸和醛糖二酸代谢	6	
6	β -丙氨酸代谢	15	6
7	抗生素生物合成	51	
8	不饱和脂肪酸生物合成	12	
9	生物素代谢	6	
10	丁酸代谢	9	6
11	细胞周期-酵母		12
12	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	12	
13	DNA 复制		15
14	脂肪酸降解		6
15	脂肪酸代谢	18	6
16	半乳糖代谢		6

[0065]	17	甘油脂质代谢	12	
	18	组氨酸代谢	12	
	19	同源重组		9
	20	赖氨酸生物合成	9	
	21	赖氨酸降解	12	
	22	减数分裂-酵母		15
	23	代谢途径	120	27
	24	错配修复		6
	25	单胺菌素生物合成	6	
	26	核苷酸切除修复		6
	27	泛酸和辅酶 A 生物合成	12	
	28	戊糖和葡糖醛酸转换		6
	29	过氧化物酶体	27	6
	30	丙酮酸代谢	18	
	31	淀粉和蔗糖代谢		9
	32	类固醇生物合成	9	
	33	色氨酸代谢	9	
	34	泛醌和其他类萜-醌生物合成	9	
	35	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成	12	
	36	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	15	6
		总计	453	147

[0066] [实施例5] DAME耐受突变株 (ES5) 的全碱基测序以及与耐受性改善相关的候选基因的搜索

[0067] 为了鉴定与通过进化工程方法获得的ES5菌株的DAME耐受性改善相关的基因,对ES5菌株进行全碱基测序。使用DNA分离试剂盒 (Epicentre, Madison, WI, USA) 进行用于全碱基测序的基因组DNA提取。使用Illumina Hiseq 2500NGS平台 (DNA Link USA, INC., San Diego, CA, USA) 分析全碱基序列。

[0068] 通过全碱基测序获得了总共13,256,614个读数,其覆盖了全碱基序列的约87.98%,然后使用Picard tool 1.128软件进行比对。使用SNPEff 4.1 (GRCh 37.75) 对比对的序列注释,并使用BWA7.12软件进行绘谱。在这种情况下,通过dbSNP138软件删除SNP DB。最后,通过比较通过NCBI、Uniprot、KEGG数据库获得的基因,鉴定发生突变的基因。

[0069] 结果,证实在总共770个基因中发生了突变,获得了排除功能未鉴定的基因在外的总共106个突变基因。其中,选择了预期参与对细胞毒性底物的耐受性改善并与癸二酸产量增加有关的基因LIP1 (脂肪酶, Uniprot.ID:C5M8S7)、FAT1 (脂肪酸转运蛋白, Uniprot.ID:C5M964)、MRP1 (多药耐药蛋白CDR1, Uniprot.ID:C5M804),并将它们分别命名为LIP1 (SEQ ID NO:1)、FAT1 (SEQ ID NO:2) 和MRP1 (SEQ ID NO:3)。它们的突变基因被命名为mtLIP1 (SEQ ID NO:4)、mtFAT1 (SEQ ID NO:5) 和mtMRP1 (SEQ ID NO:6)。各基因的突变位点列于表

3、表4和表5中。

[0070] [表3]

[0071] LIP1基因(Seq_1-LIP1,Seq_2-mtLIP1)

[0072]

Seq_1	1	atgagatttcttgattcattacaattattacatgggttgaaaactgtatcaactgctcat	60
Seq_2	1	aagagatttcttgattcattacaattattacatgggttgaaaactgtatcaactgctcat	60
Seq_1	61	attcctgcaccacttgctgatccaagtagagatgagttttatactccatctccaggtttt	120
Seq_2	61	attcctgcaccacttgctgatccaagtagagatgagttttatactccatctccaggtttt	120
Seq_1	121	gaatacgcctactccaggaactattttaaaaatccgtccaactcctcgctgttcgtaaat	180
Seq_2	121	gaatacgcctactccaggaactattttaaaaatccgtccaactcctcgctgttcgtaaat	180
Seq_1	181	ttattattctttcatgttccttttaaaaactcctggcaattgttgggttagatctcaagat	240
Seq_2	181	ttattattctttcatgttccttttaaaaactcctggcaattgttgggttagatctcaagat	240
Seq_1	241	tcttttggtgaacctaatgcttatagttactacaattccttgaaacctatgaattcaaatcct	300
Seq_2	241	tcttttggtgaacctaatgcttatagttactacaattccttgaaacctatgaattcaaatcct	300
Seq_1	301	tcaaaaattttatcttatcaaaacttttgaagattcaacttcattaaaaatgcgtaccagt	360
Seq_2	301	tcaaaaattttatcttatcaaaacttttgaagattcaacttcattaaaaatgcgtaccagt	360
Seq_1	361	tataatatacaagttggtattccaccatttggaatgttgctacccaatttgaaatgaaa	420
Seq_2	361	tataatatacaagttggtattccaccatttggaatgttgctacccaatttgaaatgaaa	420
Seq_1	421	tttataattcctgctttaataaaggatattttgttaattagtcctgattatgaaggacca	480
Seq_2	421	tttataattcctgctttaataaaggatattttgttaattagtcctgattatgaaggacca	480
Seq_1	481	agaggtgcatttactgttggtgcacaaagcagcacatgcagtataggattctattcgtgct	540
Seq_2	481	agaggtgcatttactgttggtgcacaaagcagcacatgcagtataggattctattcgtgct	540
Seq_1	541	gtattgaattctgggtctataaacttctattgatccagatgctaaagtgtgcaatgtgggt	600
Seq_2	541	gtattgaattctgggtctataaacttctattgatccagatgctaaagtgtgcaatgtgggt	600
Seq_1	601	tattctggaggatccttagcatcaagtgggcagctgtaatgcaacctgaatatgcacct	660
Seq_2	601	tattctggaggatccttagcatcaagtgggcagctgtaatgcaacctgaatatgcacct	660
Seq_1	661	gaattatcaaaataatttaaatagggtgctgcctt-gggaggatttgttactaatataactgc	719
Seq_2	661	gaattgtcaaaataatttaaatagggtgctgccttggggaggatttgttactaatataactgc	720
Seq_1	720	tgttgctgaatatcttgatagaactccacttctgggtcttggtccagtagcacttaatgg	779
Seq_2	721	tgttgctgaatatcttgatagaactccacttctgggtcttggtccagtagcacttaatgg	780
Seq_1	780	attagccaatgaatatccattgggttagacaattgcttaatcaagaaataagtcctaaaaa	839
Seq_2	781	attagccaatgaatatccattgggttagacaattgcttaatcaagaaataagtcctaaaaa	840
Seq_1	840	aaatgcaagttttcatcgtggagttcaaaaatgttttctcctgctatagcttatatttag	899
Seq_2	841	aaatgcaagttttcatcgtggagttcaaaaatgttttctcctgctatagcttatatttag	900
Seq_1	900	aggaagaactattcttggtagaataaatgaaaagaaagcaatgtttcctaatggatggca	959

[0073]

Seq_2	901	aggaagaactattcttggtagaaataatgaaaagaaagcaatgtttcctaattggatggca	960
Seq_1	960	tttacttgataatcct-gatttttttgaaattcttgataaaaaataatttgattttcttata	1018
Seq_2	961	tttacttgataatcccggtatttttttgaaattcttgataaaaaataatttgattttcttata	1020
Seq_1	1019	acgcaattccaaaaattccaatatattgtatatcatggaacaaaa--gatggagttgttcc	1076
Seq_2	1021	acgcaattccaaaaattccaatatattgtatatcatggaacaaaaagatggagttgttcc	1080
Seq_1	1077	gatttcctatgctcataaaattttcgataaatgggtgtgatgaggaattgaatcgtttga	1136
Seq_2	1081	gatttcctatgctcataaaattttcgataaatgggtgtgatgaggaattgaatcgtttga	1140
Seq_1	1137	atttgcagaaatctttaactactggacatatattggaacttttactgggtgctgcagccgc	1196
Seq_2	1141	atttgcagaaatctttaactactggacatatattggaacttttactgggtgctgcagccgc	1200
Seq_1	1197	ttggacttggttacaaaaacgatttgatgatgtacctccatataatggttgtttccatag	1256
Seq_2	1201	ttggacttggttacaaaaacgatttgatgatgtacctccatataatggttgtttccatag	1260
Seq_1	1257	aagaagactcactaatttgaagtaacacgggagcatcaaagagtataattgattattacga	1316
Seq_2	1261	aagaagactcactaatttgaagtaacacgggagcatcaaagagtataattgattattacga	1320
Seq_1	1317	tgggttggtttaaagaaagcttcactgtgaagaatagtacctatcttgtctag	1368
Seq_2	1321	tgggttggtttaaagaaagcttcactgtgaagaatagtacctatcttgtctag	1372

[0074] [表4]

[0075] FAT1基因 (Seq_1-FAT1.Seq_2-mtFAT1)

[0076]

Seq_1	1	atgtcaggattagaaattgctgcagctgccgttcttggtagtcagttattagaagccaaa	60
Seq_2	1	atgtcaggattagaaattgctgcagctgccgttcttggtagtcagttattagaagccaaa	60
Seq_1	61	tatttaatttccgatgatgtactgttggccaaaacagttgctcttaatgcacttccatat	120
Seq_2	61	tatttaatttccgatgatgtactgttggccaaaacagttgctcttaatgcacttccatat	120
Seq_1	121	ttatggaaagcctccaggggttaaagcttcataattgggtatttctttgaaaaatcagttatt	180
Seq_2	121	ttatggaaagcctccaggggttaaagcttcataattgggtatttctttgaaaaatcagttatt	180
Seq_1	181	aaaaatccaaataataaagcattggcatttccaagaccaagaagaatgcaccaccacca	240
Seq_2	181	aaaaatccaaataataaagcattggcatttccaagaccaagaagaatgcaccaccacca	240
Seq_1	241	aaggttgatgatgaaggatttcaaatttatgacgatcaatttgacctagaagaatatacc	300
Seq_2	241	aaggttgatgatgaaggatttcaaatttatgacgatcaatttgacctagaagaatatacc	300
Seq_1	301	tataaggaattgtatgacatgggtttgaaatactcttacattttgaaacatgaatatgggt	360
Seq_2	301	tataaggaattgtatgacatgggtttgaaatactcttacattttgaaacatgaatatgggt	360
Seq_1	361	gttactgcaaatgatactattgggtgttcttgtatgaataaaccacttttcattgtttta	420
Seq_2	361	gttactgcaaatgatactattgggtgttcttgtatgaataaaccacttttcattgtttta	420
Seq_1	421	tgggttggccttatggaatatgggtgacctggcagcatttttgaatttcaacaccaaagat	480
Seq_2	421	tgggttggccttatggaatatgggtgacctggcagcatttttgaatttcaacaccaaagat	480
Seq_1	481	aaaccattgatctactgtcttaaaattgtcaatgctagtcaagtttctgttgatcctgat	540
Seq_2	481	aaaccattgatctactgtcttaaaattgtcaatgctagtcaagtttctgttgatcctgat	540
Seq_1	541	tgtgatgctccaatcaaagatactgaaatctcaaataaagaggaattaccacatgttaga	600
Seq_2	541	tgtgatgctccaatcaaagatactgaaatctcaaataaagaggaattaccacatgttaga	600
Seq_1	601	ataaattacattgatgaatttgcttttgt-ttgatagattaagactcaagtcactccaaa	659
Seq_2	601	ataaattacattgatgaatttgcttttgtattgatagattaagactcaagtcactccaaa	660
Seq_1	660	atacagagctgaagatagtagtagaagaccaacagataccgattcttccgcctgtgcgtt	719
Seq_2	661	atacagagctgaagatagtagtagaagaccaacagataccgattcttccgcctgtgcgtt	720
Seq_1	720	gatctatacatcagggtaccactgggtttaccaaaagcagggtatcatgtcttggagaaaagc	779
Seq_2	721	gatctatacatcagggtaccactgggtttaccaaaagcagggtatcatgtcttggagaaaagc	780
Seq_1	780	attcatggcttctgttttcttggccatattatgaaaattagaatgattccaatgtttt	839
Seq_2	781	attcatggcttctgttttcttggccatattatgaaaattagaatgattccaatgtttt	840
Seq_1	840	aacagctatgccattgtatcattcaacagctgctatgttgggtttgtgtcctactttaat	899
Seq_2	841	tacagttatgccattgtatcattcaacagctgctatgttgggtttgtgtcctactttaat	900
Seq_1	900	tgttgggtgtgtgtttctgttttctcaaaaattctcagccacttcattctggactcaagc	959

[0077]

Seq_2	901	tgttggtggttggtgtttctgtttctcaaaaattctcagccacttcattctggactcaagc	960
Seq_1	960	tagattatgtggtgccacacatattcaatatgttggtgaagtttgtcgttatattgttaaa	1019
Seq_2	961	tagattatgtggtgccacacatattcaatatgttggtgaagtttgtcgttatattgttaaa	1020
Seq_1	1020	ctcaaaacatcaccagatcaagatagacacaatgtttaaattgcctatggtaattggatt	1079
Seq_2	1021	ctcaaaacatcaccagatcaagatagacacaatgtttaaattgcctatggtaattggatt	1080
Seq_1	1080	acgtccagatatatggtctgaattcaagagaagattccacattgaaggtattggggaatt	1139
Seq_2	1081	acgtccagatatatggtctgaattcaagagaagattccacattgaaggtattggggaatt	1140
Seq_1	1140	ttatgcagctactgaatctccaattgccactacaaacttacaatacgggtgaataatggtgt	1199
Seq_2	1141	ttatgcagctactgaatctccaattgccactacaaacttacaatacgggtgaataatggtgt	1200
Seq_1	1200	aggtgcctgtcgttaataatggttcactttatagttttattgttatctacccaacaaaaatt	1259
Seq_2	1201	aggtgcctgtcgttaataatggttcactttatagttttattgttatctacccaacaaaaatt	1260
Seq_1	1260	ggccaagatggatccagaagatgaaagtgaattttataaggatccaaaaactggattttg	1319
Seq_2	1261	ggccaagatggatccagaagatgaaagtgaattttataaggatccaaaaactggattttg	1320
Seq_1	1320	tgttgaagctgcatataatgaacctggtgaattggtgatgagaattttaaatcctaataga	1379
Seq_2	1321	tgttgaagctgcatataatgaacctggtgaattggtgatgagaattttaaatcctaataga	1380
Seq_1	1380	tattcaaaaatcattccaagggttattatggttaacaaatctgctaccaatagcaaaattct	1439
Seq_2	1381	tattcaaaaatcattccaagggttattatggttaacaaatctgctaccaatagcaaaattct	1440
Seq_1	1440	cacgaatgttttcaaaaaaggagatgcttggtatagaagtggtagacttgttgaaaatgga	1499
Seq_2	1441	cacgaatgttttcaaaaaaggagatgcttggtatagaagtggtagacttgttgaaaatgga	1500
Seq_1	1500	tgaacatcaattgttgatatttctgtgatagattgggtga----tacctccgttggaatt	1555
Seq_2	1501	tgaacatcaattgttgatatttctgtgatagattgggtga---tacctccgttggaatt	1560
Seq_1	1556	cagaaaatgtttcagcaactgaagttgaaaatgagttgatgggatctaaagcattgaaac	1615
Seq_2	1561	cagaaaatgtttcagcaactgaagttgaaaatgagttgatgggatctaaagcattgaaac	1620
Seq_1	1616	aatctgttgttgttggtgttaaagttcca--aatcacgaaggtagagcttgttttgcctgt	1673
Seq_2	1621	aatctgttgttgttggtgttaaagttccaggaatcacgaaggtagagcttgttttgcctgt	1680
Seq_1	1674	atgtgaagcaaaagatgatttaactcatgaagatattttgaaattgattcatggacatgt	1733
Seq_2	1681	atgtgaagcaaaagatgatttaactcatgaagatattttgaaattgattcatggacatgt	1740
Seq_1	1734	tactaaatcgtttaccagtttatgcacaacctgcattcattaaatcggatccattgaagc	1793
Seq_2	1741	tactaaatcgtttaccagtttatgcacaacctgcattcattaaatcggatccattgaagc	1800
Seq_1	1794	ttctcataatcataaagtccaaagaatcaatttaagaatcaaaaattaccaaaagggtga	1853
Seq_2	1801	ttctcataatcataaagtccaaagaatcaatttaagaatcaaaaattaccaaaagggtga	1860
Seq_1	1854	agatggtaaaagacttgatttactggttgaaatgggtgataaatacaagagttgactgaaga	1913
Seq_2	1861	agatggtaaaagacttgatttactggttgaaatgggtgataaatacaagagttgactgaaga	1920
Seq_1	1914	ggattggtcctttgatctgtactggttaaagccaaattgtaa	1953
Seq_2	1921	ggattggtcctttgatctgtactggttaaagccaaattgtaa	1960

[0078] [表5]

[0079] MRP1基因 (Seq_1-MRP1.Seq_2-mtMRP1)

[0080]

Seq_1	1	atgggagaaataaccccaactgacaaaagcgaagaccagtcaatgggttaatgcataatcat	60
Seq_2	1	atgggagaaataaccccaactgacaaaagcgaagaccagtcaatgggttaatgcataatcat	60
Seq_1	61	ggatttgatactcatgcatcagaagatatacaagatttagccaaaactttactcatcat	120
Seq_2	61	ggatttgatactcatgcatcagaagatatacaagatttagccaaaactttactcatcat	120
Seq_1	121	tcaattggcgatgggtactgatgggttacaaaagatatcttacaatatgacagaagtacca	180
Seq_2	121	tcaattggcgatgggtactgatgggttacaaaagatatcttacaatatgacagaagtacca	180
Seq_1	181	ggatataaatccttacaccgaagatatattacactagtgaaccaattgaatccagactcagat	240
Seq_2	181	ggatataaatccttacaccgaagatatattacactagtgaaccaattgaatccagactcagat	240
Seq_1	241	aattttaaatgcaaaagttttggatcaagaacttgagaaaattgtatgattccagatccagat	300
Seq_2	241	aattttaaatgcaaaagttttggatcaagaacttgagaaaattgtatgattccagatccagat	300
Seq_1	301	tattacaagccatcaagattgggagttgcctatagagatttaagagcttatgggtgtggcc	360
Seq_2	301	tattacaagccatcaagattgggagttgcctatagagatttaagagcttatgggtgtggcc	360
Seq_1	361	aatgattctgattaccagcccactgtggcaaacgcggtctggaagtttatcaaagaggga	420
Seq_2	361	aatgattctgattaccagcccactgtggcaaacgcggtctggaagtttatcaaagaggga	420
Seq_1	421	ttgcattatttagaaaaaggtgatgggtcaagggtattttgatattttaaaatcaatggat	480
Seq_2	421	ttgcattatttagaaaaaggtgatgggtcaagggtattttgatattttaaaatcaatggat	480
Seq_1	481	ggaaataatgaaaccaggtgaacttacagttggttttaggtagaccaggggtggtgttcc	540
Seq_2	481	ggaaataatgaaaccaggtgaacttacagttggttttaggtagaccaggggtggtgttcc	540
Seq_1	541	acattggtgaaaacataggcttcacaaacatatggatttcataattggaaaagaatcaaaa	600
Seq_2	541	acattggtgaaaacataggcttcacaaacatatggatttcataattggaaaagaatcaaaa	600
Seq_1	601	atcagttatgatgggtttaactcctccgaaaatcgaaaaaacttataggggttaattgtgta	660
Seq_2	601	atcagttatgatgggtttaactcctccgaaaatcgaaaaaacttataggggttaattgtgta	660
Seq_1	661	tactctgcagaaacagatgttcattttccacatttgactgtcggacaagtcttggaattt	720
Seq_2	661	tactctgcagaaacagatgttcattttccacatttgactgtcggacaagtcttggaattt	720
Seq_1	721	gctgctagaatgagaacgccacagaaacagaggtgaagggtgtagatagagaaacatatgcc	780
Seq_2	721	gctgctagaatgagaacgccacagaaacagaggtgaagggtgtagatagagaaacatatgcc	780
Seq_1	781	aaacaccttgctagtgttttatatgggtacttatgggttatctcatacaagaaataccaat	840
Seq_2	781	aaacaccttgctagtgttttatatgggtacttatgggttatctcatacaagaaataccaat	840
Seq_1	841	gtgggttaacgattttgtcagaggagtttctgggtggtgaaagaaaaaggtctccattgct	900

[0081]

Seq_2	841	gtgggtaacgattttgtcagaggagtcttctgggtggaagaaaaagggtctccattgct	900
Seq_1	901	gaagtttcgttgagtggtgcaaatgttcaatgttgggataatgccactagaggtttggat	960
Seq_2	901	gaagtttcgttgagtggtgcaaatgttcaatgttgggataatgccactaaagggttggat	960
Seq_1	961	gctgcaaccgcattggaattcatcagagcattgaagacttctgctgctattttgaaagt	1020
Seq_2	961	gctgcaaccgcattggaattcatcagagcattgaagacttctgctgctattttgaaagt	1020
Seq_1	1021	acccatttgatttgctatttatcaatgttcacaagatgcttatgacttggttgataatgct	1080
Seq_2	1021	acccatttgatttgctatttatcaatgttcacaagatgcttatgacttggttgataatgct	1080
Seq_1	1081	gtcgttttgatgaagggtttccaaattttttttggttaaagccaataaagccaaggagt	1140
Seq_2	1081	gtcgttttgatgaagggtttccaaattttttttggttaaagccaataaagccaaggagt	1140
Seq_1	1141	tttgtaaacatgggatacaagtgctcctcaagacaaaacactgctgactttttaactca	1200
Seq_2	1141	tttgtaaacatgggatacaagtgctcctcaagacaaaacactgctgactttttaactca	1200
Seq_1	1201	ttgactaatccagctgaaagagagccattaccaggttatgagaataaagtcccaaggact	1260
Seq_2	1201	ttgactaatccagctgaaagagagccattaccaggttatgagaataaagtcccaaggact	1260
Seq_1	1261	cctcaagaatttgaaagcatattggaagaaatccccagagtatactgcattgggttaatgaa	1320
Seq_2	1261	cctcaagaatttgaaagcatattggaagaaatccccagagtatactgcattgggttaatgaa	1320
Seq_1	1321	attgattcatatttcattgagtgtagaataaataaacaccagacaactctaccaagattca	1380
Seq_2	1321	attcattcatatttcattgagtgtagaataaataaacaccagacaactctaccaagattca	1380
Seq_1	1381	catgttgcaagacaatccaacaatatctgtccatcttcacatatactgtatcatttttc	1440
Seq_2	1381	catgttgcaagacaatccaacaatatctgtccatcttcacatatactgtatcatttttc	1440
Seq_1	1441	atgcaagtaagtatgtttatacaaaagaaatctcctccgtatgaaagctgatccatcgatt	1500
Seq_2	1441	atgcaagtaagtatgtttatacaaaagaaatctcctccgtatgaaagctgatccatcgatt	1500
Seq_1	1501	ccgttgactactatttttctcacaactagttatgggacttattcttgccctcggtatattac	1560
Seq_2	1501	ccgttgactactatttttctcacaactagttatgggacttattcttgccctcggtatattac	1560
Seq_1	1561	aatcttcctgcaacttcagggtcttttttactaccgatccggtgcgctttactttggtttg	1620
Seq_2	1561	aatcttcctgcaacttcagggtcttttttactaccgatccggtgcgctttactttggtttg	1620
Seq_1	1621	ttatttaatgctattttcgtccctacttgaaattattgccccttttgaaagcaagaccatt	1680
Seq_2	1621	ttatttaatgctattttcgtccctacttgaaattattgccccttttgaaagcaagaccatt	1680
Seq_1	1681	gttgagaaacataaaaaatagccctttatcgctccatcagcagatgcattagcaagtatt	1740
Seq_2	1681	gttgagaaacataaaaaatagccctttatcgctccatcagcagatgcattagcaagtatt	1740
Seq_1	1741	ataagtgagttaccagtttaagtttttttcaatccttggtttcaacattcctttctatttt	1800
Seq_2	1741	ataagtgagttaccagtttaagtttttttcaatccttggtttcaacattcctttctatttt	1800
Seq_1	1801	atgggttaaccttagaagagatgctggtagattcttcttttatgggttaattgggtatatta	1860
Seq_2	1801	atgggttaaccttagaagagatgctggtagattcttcttttatgggttaattgggtatatta	1860

[0082]

Seq_1	1861	ggtacattcattatgtcacactttattcagatctattggtgcagttatttactacttttagca	1920
Seq_2	1861	ggtacattcattatgtcacactttattcagatctattggtgcagttatttactacttttagca	1920
Seq_1	1921	ggtgctatgactccggcgggggtgattttatttagcaatgatattatttgctggatttgtc	1980
Seq_2	1921	ggtgctatgactccggcgggggtgattttatttagcaatgatattatttgctggatttgtc	1980
Seq_1	1981	attccatttccaagcatggttgggttgggtctaaatggataaaatggataaaatcctgtcact	2040
Seq_2	1981	attccatttccaagcatggttgggttgggtctaaatggataaaatggataaaatcctgtcact	2040
Seq_1	2041	tatttgtttgaatcacttatggtaaacgagtatcataatagagagtttgaatgcagtgat	2100
Seq_2	2041	tatttgtttgaatcacttatggtaaacgagtatcataatagagagtttgaatgcagtgat	2100
Seq_1	2101	ttcgtacctatgggaccaggatatagagaatcttagtcttgaaaaaagggttggttcaagt	2160
Seq_2	2101	ttcgtacctatgggaccaggatatagagaatcttagtcttgaaaaaagggttggttcaagt	2160
Seq_1	2161	ttgggtggcatccctggtagtgcttttggttcaaggtagatattttaagacttggattt	2220
Seq_2	2161	ttgggtggcatccctggtagtgcttttggttcaaggtagatattttaagacttggattt	2220
Seq_1	2221	gccttttctaaactcccataaagtgagaaaattttggatatctggttgcgtttgctgtgtt	2280
Seq_2	2221	gccttttctaaactcccataaagtgagaaaattttggatatctggttgcgtttgctgtgtt	2280
Seq_1	2281	cttttgtttctttatggttgcattgactgaaactcaataaagggtgctatgcaaaaagggtgaa	2340
Seq_2	2281	cttttgtttctttatggttgcattgactgaaactcaataaagggtgctatgcaaaaagggtgaa	2340
Seq_1	2341	attgtgttgtttcttagaggatcctttgaagaaatacaagagaaactccagtagcgagat	2400
Seq_2	2341	attgtgttgtttcttagaggatcctttgaagaaatacaagagaaactccagtagcgagat	2400
Seq_1	2401	attgaatccggtaaagaaatagtgaaatttaatttccaagacgaagcagaatcttctaatt	2460
Seq_2	2401	attgaatccggtaaagaaatagtgaaatttaatttccaagacgaagcagaatcttctaatt	2460
Seq_1	2461	agtgatcgtattgatgaaaagggttctacgggcagtgagaattactaccagacaacaga	2520
Seq_2	2461	agtgatcgtattgatgaaaagggttctacgggcagtgagaattactaccagacaacaga	2520
Seq_1	2521	gaaattttcttttggagaatttgacatatcaagtcaagattaagaaagaagatagagtc	2580
Seq_2	2521	gaaattttcttttggagaatttgacatatcaagtcaagattaagaaagaagatagagtc	2580
Seq_1	2581	attttagaccatggttgatggttgggttaaacagggtcaaatattactgcattgatgggtgca	2640
Seq_2	2581	attttagaccatggttgatggttgggttaaacagggtcaaatattactgcattgatgggtgca	2640
Seq_1	2641	tctggtgctggttaagaccactttggtgaattgtttatctgagagagtaactactggtgtt	2700
Seq_2	2641	tctggtgctggttaagaccactttggtgaattgtttatctgagagagtaactactggtgtt	2700
Seq_1	2701	attactgatggtgtgagaatggttaatggtcatgcgttagattcttcgttccaaagatca	2760
Seq_2	2701	attactgatggtgtgagaatggttaatggtcatgcgttagattcttcgttccaaagatca	2760
Seq_1	2761	attggttatgtgcaacaacaagatgttcatttacagacatctacagttagagaagcggttg	2820
Seq_2	2761	attggttatgtgcaacaacaagatgttcatttacagacatctacagttagagaagcggttg	2820

[0083]

Seq_1	2821	caattctccgcataatttgagacaatcaaacaaaatatctaagaaggagaaggatgaatat	2880
Seq_2	2821	caattctccgcataatttgagacaatcaaacaaaatatctaagaaggagaaggatgaatat	2880
Seq_1	2881	gttgactacgtcattgacttgttggagatgactaactatgaggatgcattggttgggtgtt	2940
Seq_2	2881	gttgactacgtcattgacttgttggagatgactaactatgaggatgcattggttgggtgtt	2940
Seq_1	2941	gccggtgaagggttgaatgttgaacaaagaaagagattaacccatcggtgttgaattagtt	3000
Seq_2	2941	gccggtgaagggttgaatgttgaacaaagaaagagattaacccatcggtgttgaattagtt	3000
Seq_1	3001	gccaagcctaagttgttactattcttggatgaaccaacttctgggttagactcccaact	3060
Seq_2	3001	gccaagcctaagttgttactattcttggatgaaccaacttctgggttagactcccaact	3060
Seq_1	3061	gcctgggtctattttgtaagttgatgagaaagttagctgatcatgggtcaagctatcttgtgt	3120
Seq_2	3061	gcctgggtctattttgtaagttgatgagaaagttagctgatcatgggtcaagctatcttgtgt	3120
Seq_1	3121	acaattcatcaaccttccgcacttatattggctgaattcgatagattgttgttttgcaa	3180
Seq_2	3121	acaattcatcaaccttccgcacttatattggctgaattcgatagattgttgttttgcaa	3180
Seq_1	3181	aagggtggttagaactgcttatatttgggtgacttgggtaaaaactgtcaaacatgattgac	3240
Seq_2	3181	aagggtggttagaactgcttatatttgggtgacttgggtaaaaactgtcaaacatgattgac	3240
Seq_1	3241	tactttgaaaaacacggagcagatccatgtcccaaagaagccaatccagcagaatggatg	3300
Seq_2	3241	tactttgaaaaacacggagcagatccatgtcccaaagaagccaatccagcagaatggatg	3300
Seq_1	3301	ttggaagttgttgggtgccgctccaggctcccatgtctaaacaggactattttgaagtttgg	3360
Seq_2	3301	ttggaagttgttgggtgccgctccaggctcccatgtctaaacaggactattttgaagtttgg	3360
Seq_1	3361	agaaactctgcgaatatagagctgttcaaaaatgaaatcaccccatatggaaactgaatta	3420
Seq_2	3361	agaaactctgcgaatatagagctgttcaaaaatgaaatcaccccatatggaaactgaatta	3420
Seq_1	3421	gttaaatataccaagagatgaagatcccgaagcacttttgaatacgcctgcacccatttgg	3480
Seq_2	3421	gttaaatataccaagagatgaagatcccgaagcacttttgaatacgcctgcacccatttgg	3480
Seq_1	3481	aaacaatatattgcttgttagttggagggcgattgtacaagattggagatcacctggatat	3540
Seq_2	3481	aaacaatatattgcttgttagttggagggcgattgtacaagattggagatcacctggatat	3540
Seq_1	3541	atatactccaaatatttcttggattatcggtgtcatctatattgattggattttcattttt	3600
Seq_2	3541	atatactccaaatatttcttggattatcggtgtcatctatattgattggattttcattttt	3600
Seq_1	3601	aaagccaaaaatacagttcaagggttgacgaatcaaatgcttgcctatatttatgttcaca	3660
Seq_2	3601	aaagccaaaaatacagttcaagggttgacgaatcaaatgcttgcctatatttatgttcaca	3660
Seq_1	3661	gttcaattcacaaactattattgaccaaattgttgcattttttgttcgacaacgtgaggtg	3720
Seq_2	3661	gttcaattcacaaactattattgaccaaattgttgcattttttgttcgacaacgtgaggtg	3720
Seq_1	3721	tatgaggttagagaagcaccttcagaaacatatagttgggttgccttcattacaggtcaa	3780
Seq_2	3721	tatgaggttagagaagcaccttcagaaacatatagttgggttgccttcattacaggtcaa	3780
Seq_1	3781	ataacttcagagcttccttatcaataaattgttggacgattgctttcttctgctggtac	3840

[0084]

Seq_2	3781	ataacttcagagcttcttatcaataattgttggaacgattgctttcttctgctggtac	3840
Seq_1	3841	tatcctgttggtattatataccaatgctgaaacctacacatagtgtgactgaacgtggtgcc	3900
Seq_2	3841	tatcctgttggtattatataccaatgctgaaacctacacatagtgtgactgaacgtggtgcc	3900
Seq_1	3901	ttgatgtggttgtttattacttcattttttgtttacacatcaacatttgggtcaattatgt	3960
Seq_2	3901	ttgatgtggttgtttattacttcattttttgtttacacatcaacatttgggtcaattatgt	3960
Seq_1	3961	atgtcattcaatgaagatattgaaaatgctggaactgttgcgtgctacattattcaccttg	4020
Seq_2	3961	atgtcattcaatgaagatattgaaaatgctggaactgttgcgtgctacattattcaccttg	4020
Seq_1	4021	tgtttgataattttgtggtgttatggttggtccagagaatatgccacgattttggattttc	4080
Seq_2	4021	tgtttgataattttgtggtgttatggttggtccagagaatatgccacgattttggattttc	4080
Seq_1	4081	atgtacagatgtaatccatttacttatatgattcaagggtgttctttcaacgggattagct	4140
Seq_2	4081	atgtacagatgtaatccatttacttatatgattcaagggtgttctttcaacgggattagct	4140
Seq_1	4141	cgcaataaagtgtgtttgtgctgcaagagaacttgttctgcttcaaccaccaaagggtcaa	4200
Seq_2	4141	cgcaataaagtgtgtttgtgctgcaagagaacttgttctgcttcaaccaccaaagggtcaa	4200
Seq_1	4201	acttgttcttcattcttggatccttatatcagtggtggtggaggttattattacctaata	4260
Seq_2	4201	acttgttcttcattcttggatccttatatcagtggtggtggaggttattattacctaata	4260
Seq_1	4261	aatgatggaacttgttcttctgttcagtagataaatactgatatgtttttacatcgtatc	4320
Seq_2	4261	aatgatggaacttgttcttctgttcagtagataaatactgatatgtttttacatcgtatc	4320
Seq_1	4321	catgccttatatacagtgagagatggagaaaattttggattatttattacattcattgtgatt	4380
Seq_2	4321	catgccttatatacagtgagagatggagaaaattttggattatttattacattcattgtgatt	4380
Seq_1	4381	aatggtgtcttgaactgtattctttttattggttagctagggtaacaaaagggtcaagatca	4440
Seq_2	4381	aatggtgtcttgaactgtattctttttattggttagctagggtaacaaaagggtcaagatca	4440
Seq_1	4441	aagactaaaaagtga	4455
Seq_2	4441	aagactaaaaagtga	4455

[0085] [实施例6]过表达mtLIP1、mtFAT1和mtMRP1基因的菌株的制备及表型变化

[0086] [表6]

[0087] 用于克隆耐受性基因的引物列表

[0088]

SEQ ID NO	引物	5'-3'序列
在 PRS420 中克隆 pADH2 启动子		
7	ADHpro_F	AAACTCGAGTCTAGCTCCCTAACATGTAGGT (XhoI)
8	ADHpro_R	AAAGTCGACAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGCTT
在 PRS420 中克隆 pADH2 终止子		
9	ADHter_F	AAAGTCGACTCTAGATAAGCGAATTCTTATGATTTATGATT TTTA (SalI-XbaI)
10	ADHter_R	AAAGCGGCCGCGTGTGGAAGAACGATTACAACAG (NotI)
单独克隆		
11	LIP1_F	AAAGTCGACATGAGATTTCTTGTATTCAATTATTACATGGTTGAAAAC (SalI)
12	LIP1_R	AAATCTAGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGACAAGATAGGTA CTATTCTTCACAGTGAAGCTT (XbaI)

[0089]

13	<i>FAT1_F</i>	AAAGTCGACATGTCAGGATTAGAAATTGCTGCAGCTGCC (Sall)
14	<i>FAT1_R</i>	AAATCTAGACAATTTGGCTTTACCAGTACAGATCAAAGACC A (XbaI)
15	<i>MRP1_F</i>	AAAGTCGACATGGGAGAAATAACCCCAACTGACAAAAGCG (Sall)
16	<i>MRP1_R</i>	AAATCTAGACTTTTTAGTCTTGACCCTTTTGGTACC (XbaI)
组合克隆		
17	P1_F	AAAGGATCCTCTAGCTCCCTAACATGTAGGT (BamHI)
18	P1_R	AAAGTCGACAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGCTT (Sall)
19	P2_F	AAAGTCGACCACGTGTCTAGCTCCCTAACATGTAGGT (Sall-PmlI)
20	P2_R	AAAGCGGCCCGCAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGCTT (NotI)
21	P3_F	AAAGTCGACTAAGCGAATTTCTTATGATTATGATTTTAA (Sall)
22	P3_R	AAACACGTGGTGTGGAAGAACGATTACAACAG (PmlI)
23	P4_F	CAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGTCGACATGAGATTCTTG TATTCATTACAATTATT (Sall)
24	P4_R	GTAACTAAGCGAATTTCTTATGATTATGTCGACAGTGGTG GTGGTGGTGGTG (Sall)
25	P5_F	CAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGCGGGCCGCATGTCAGGAT TAGAAATTGCTGCA (NotI)
26	P5_R	GTAACTAAGCGAATTTCTTATGATTATGCGGCCGCACAAT TTGGCTTTACCAGTACAGA (NotI)
27	P6_F	AAAGCGGCCCGCATAAGCGAATTTCTTATGATTATGATTTTT A (NotI)
28	P6_R	AAACTCGAGCACGTGAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGCTT (XhoI-PmlI)
29	P7_F	AAACACGTGTAAGCGAATTTCTTATGATTATGATTTTAA (PmlI)
30	P7_R	AAACTCGAGGTGTGGAAGAACGATTACAACAG (XhoI)
31	P8_F	CAGTTGATTGTATGCTTGGTATAGCACGTGATGGGAGAAAT AACCCCAACTG (PmlI)
32	P8_R	GTAACTAAGCGAATTTCTTATGATTACACGTGCTTTTATG TCTTGACCCTTTTGGTA (PmlI)
33	P9_F	GCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTCTAGCT CCCTAACATGTAGGT (BamHI)
34	P9_R	GGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTCTCGAGGTGTGGAA GAACGATTACAACAG (XhoI)

[0090] 限制性酶切位点加下划线。

[0091] [表7]

[0092] 本研究使用的质粒

[0093]

质粒	说明
pET21a	大肠杆菌表达载体, Amp ^R
pAUR123	低拷贝数酵母表达载体, 酵母用 AurA ^R , 大肠杆菌用 Amp ^R
pRS420	高拷贝数酵母表达载体, 酵母用 G418R, 大肠杆菌用 Amp ^R
质粒 5	pRS420::ADHpro1
质粒 6	pRS420::ADHpro1-ADHter1
质粒 7	质粒 6+ LIP1, prs420::ADHpro1-LIP1-ADHter1
质粒 8	质粒 6+ mtLIP1, prs420::ADHpro1-mtLIP1-ADHter1
质粒 9	质粒 6+ wtFAT1, prs420::ADHpro1-FAT1-ADHter1
质粒 10	质粒 6+ mtFAT1, prs420::ADHpro1-mtFAT1-ADHter1
质粒 11	质粒 6+ wtMRP1, prs420::ADHpro1-MRP1-ADHter1
质粒 12	质粒 6+ mtMRP1, pRS420::ADHpro1-mtMRP1-ADHter1
质粒 13	pET21a::ADHpro1
质粒 14	pET21a::ADHpro2
质粒 15	pET21a::ADHter1-ADHpro2
质粒 17	pET21a::ADHpro1-ADHter1-ADHpro2
质粒 18	pET21a::ADHpro1-mtLIP1-ADHter1-ADHpro2
质粒 19	pET21a::ADHpro1-mtLIP1-ADHter1-ADHpro2-mtFAT1
质粒 20	pET21a::ADHter1-ADHpro2-mtFAT1
质粒 21	pET21a::ADHter2-ADHpro3
质粒 22	pET21a::ADHter2-ADHpro3-ADHter3
质粒 23	pET21a::ADHter2-ADHpro3-mtMRP1-ADHter3
质粒 24	pET21a::ADHpro1-mtLIP1-ADHter1-ADHpro2-mtFAT1-ADHter2-ADHpro3-mtMRP1-ADHter3
质粒 25	pRS420::ADHpro1-mtLIP1-ADHter1-ADHpro2-mtFAT1-ADHter2-ADHpro3-mtMRP1-ADHter3

[0094] [6-1]过表达LIP1基因和mtLIP1基因的菌株的制备及表型变化

[0095] 为了制备分别过表达存在于亲本菌株中的相同(无突变)基因(LIP1)和实施例5中筛选的突变基因(mtLIP1)的热带假丝酵母菌株,如下进行克隆实验。为了有效表达引入的基因,使用ADHpro_F/R引物和ADHter_F/R引物(表6)来扩增ADH启动子(在ADHpro,XhoI/Sa1I限制性酶切位点引入)和ADH终止子(在ADHter,XbaI/NotI限制性酶切位点引入),并且将ADH启动子和ADH终止子优先引入pRS420载体以构建质粒6。为了获得LIP1基因和mtLIP1基因,使用LIP1_F引物和LIP1_R引物(表5)扩增从热带假丝酵母MYA_3404菌株和热带假丝酵母ES5菌株的每种中提取的基因组DNA,并将得到的DNA片段连接到如此构建的质粒6的Sa1I和XbaI限制性酶切位点。这样,最终得到了引入了LIP1的质粒7和引入了mtLIP1的质粒8(表7)。然后,将质粒7和8转化到 β -氧化途径缺失的热带假丝酵母20962中,最终制备了热带假丝酵母_LIP1菌株和热带假丝酵母_mtLIP1菌株。

[0096] 将分别引入了LIP1基因和mtLIP1基因的菌株的表型变化与对照(β -氧化途径缺失

的热带假丝酵母菌株(β -K0))的表型变化进行比较。结果,如图6所示,证实了与 β -K0菌株相比,引入了LIP1和mtLIP1基因的菌株的生长得到了改善。特别是,证实了引入了mtLIP1基因的菌株的DCW值(约1.2g/L)最大。比较了三种菌株的DAME消耗量。结果证实,与对照相比, β -K0菌株几乎不消耗DAME,而引入了LIP1基因的菌株和引入了mtLIP1基因的菌株具有更高的底物消耗量。特别是,证实了引入了mtLIP1基因的菌株在120小时内消耗了全部底物的约70%(图7)。最后,比较了三种菌株的SA产量。结果证实, β -K0菌株和引入了mtLIP1基因的菌株产生约300mg/L的癸二酸,而引入了mtLIP1基因的菌株产生了约900mg/L的癸二酸(图8)。

[0097] 根据上述结果,证实了热带假丝酵母菌株中的LIP1基因是对热带假丝酵母菌株的生长、DAME底物的消耗以及癸二酸的产生有影响的基因,并且根据本发明获得的突变基因mtLIP1极大地有助于增加癸二酸产量。

[0098] [6-2]引入了mtFAT1基因的菌株的制备及表型变化的确认

[0099] 类似于实施例6-1,将引入了FAT1基因的菌株和引入了mtFAT1基因的菌株的表型变化与对照(β -氧化途径缺失的热带假丝酵母菌株(β -K0))的表型变化进行比较。将使用FAT1_F引物和FAT1_R引物(表6)从实施例6-1中使用的热带假丝酵母MYA_3404菌株和热带假丝酵母ES5菌株的基因组DNA扩增的DNA片段连接到质粒6中存在的pRS420载体的SalI和XbaI限制性酶切位点,以最终制备出引入了FAT1基因的质粒9和引入了mtFAT1基因的质粒10(表7)。然后将制备的质粒9和质粒10转化到 β -氧化途径缺失的热带假丝酵母20962中。最终,制备了热带假丝酵母_FAT1菌株和热带假丝酵母_mtFAT1菌株。

[0100] 结果,如图9所示,证实了 β -K0菌株与引入了FAT1基因的菌株的DCW值没有显著差异,但引入了mtFAT1基因的菌株具有高DCW值(约1.5g/L),表明了由于FAT1基因的突变,细胞的生长得到显著改善。比较了三种菌株的DAME消耗量。结果证实, β -K0菌株几乎不消耗DAME,并且与 β -K0菌株相比,引入了FAT1基因的菌株的底物消耗量没有显著差异,但引入了mtFAT1基因的菌株与对照相比具有相对较高的底物消耗量。此外,证实了引入了mtFAT1基因的菌株在120小时内消耗了全部底物的约70%(图10)。最后,比较了菌株的癸二酸产量。结果证实,经过120小时的发酵后, β -K0菌株和引入了mtFAT1基因的菌株分别产生了约280mg/L和384mg/L的癸二酸,而引入了mtFATP1基因的菌株产生了约1275mg/L的癸二酸(图11)。

[0101] 根据上述结果,证实了与LIP1基因类似,热带假丝酵母菌株中的FAT1基因是与热带假丝酵母菌株的生长、DAME底物的消耗以及癸二酸的产生相关的基因,并且还证实了根据本发明获得的mtFAT1基因极大地有助于增加癸二酸产量。

[0102] [6-3]引入了mtMRP1基因的菌株的制备及表型变化的确认

[0103] 最后,将引入了MRP1基因的菌株和引入了mtMRP1基因的菌株的表型变化与对照(β -氧化途径缺失的热带假丝酵母菌株(β -K0))的表型变化进行比较。与前面的实施例一样,用于克隆的载体是pRS420载体,其中引入了用于构建质粒6的ADHpro和ADHter。使用MRP1_F引物和MRP1_R引物扩增载体,然后连接到SalI/XhoI限制性酶切位点。以此方式构建了质粒11和质粒12,并将构建的质粒转化到 β -氧化途径缺失的热带假丝酵母20962中,以最终制备热带假丝酵母_MRP1菌株和热带假丝酵母_mtMRP1菌株。

[0104] 将通过上述方法制备的引入了MRP1基因的菌株和引入了mtMRP1基因的菌株与用作对照的 β -K0菌株进行比较。结果证实,引入了MRP1基因的菌株和引入了mtMRP1基因的菌

株的生长得到了改善。特别是证实了引入了mtMRP1基因的菌株具有高的细胞量,约1.5g/L(图12)。比较了三种菌株的DAME消耗量。结果证实,经过120小时后, β -K0菌株消耗了底物的约10%,而引入了MRP1基因的菌株消耗了底物的约40%,以及基于10g/L的初始DAME量,引入了mtMRP1基因的菌株消耗了超过约9g/L的DAME(图13)。比较了三种菌株的癸二酸产量。结果证实, β -K0菌株和引入了MRP1基因的菌株分别产生约280mg/L和约488mg/L的癸二酸,而引入了mtMRP1基因的菌株产生了约1677mg/L的癸二酸,这表明与亲本菌株相比,突变菌株的癸二酸产量增加至约6倍(图14)。

[0105] 由上述结果证实,引入的MRP1基因和mtMRP1基因诱导了菌株的表型变化,并且这些基因对提高癸二酸生产力具有积极影响。

[0106] [6-4]制备大量生产癸二酸的菌株(热带假丝酵母mtSAP7)以及通过高密度培养生产癸二酸

[0107] 制备了大量生产癸二酸的菌株(热带假丝酵母mtSAP7),该菌株中引入了在前面的实施例中证实了其效果的所有mtLIP1、mtFAT1和mtMRP1基因。为了有效表达三个引入的基因,将用于促进每个基因表达的三对ADH启动子(ADHpro1、ADHpro2和ADHpro3)和ADH终止子(ADHter1、ADHter2和ADHter3)一起引入。更具体的产生菌株的方法如下。

[0108] (1)使用T4DNA连接酶,将使用P1_F引物和P1_R引物通过PCR从pAUR123载体扩增的DNA片段(ADHpro1)连接到为进行克隆而选择的pET21a载体的BamHI/SalI限制性酶切位点,以构建质粒13。对于PCR,使用Q5High-Fidelity Master mix(BioLabs,Ipswich,MA,USA),并且在所有后续实验中使用相同的试剂。

[0109] (2)同时,将使用P2_F引物和P2_R引物通过PCR从pAUR123载体扩增的DNA片段(ADHpro2)连接到pET21a载体的SalI/NotI限制性酶切位点。在这种情况下,为了便于随后引入菌株,在正向引物的限制性内切酶SalI序列之后依次添加PmII限制性内切酶序列(CACGTG)以制备质粒14。

[0110] (3)接下来,将使用P3_F引物和P3_R引物从pAUR123载体扩增的DNA片段(ADHter1)连接到质粒14的SalI/BtrI限制性酶切位点,以制备质粒15。

[0111] (4)为了制备质粒16,使用先前制备的质粒15作为骨架。将使用质粒13作为模板并使用P1_F引物和P1_R引物扩增的DNA片段(ADHpro1)连接到质粒15的BamHI/SalI限制性酶切位点以制备质粒16。

[0112] (5)将使用P4_F引物和P4_R引物从热带假丝酵母ES5菌株的基因组DNA扩增的DNA片段(mtLIP1)连接到质粒16的ADHpro1和ADHter1之间的SalI限制性酶切位点,从而制备质粒17。

[0113] (6)为了引入mtFAT1基因,使用热带假丝酵母ES5菌株的基因组DNA作为模板并使用P5_F引物和P5_R引物,通过PCR获得mtFAT1片段。将mtFAT1片段连接到质粒17的NotI限制性酶切位点以制备质粒18。此外,随后将扩增的mtFAT1片段引入质粒15的NotI限制性酶切位点以制备最终质粒,将该最终质粒命名为“质粒19”。

[0114] (7)为了引入额外的启动子和终止子,使用质粒15作为模板并使用P6_F引物和P6_R引物,通过PCR获得ADHter2片段和ADHpro3片段。然后将ADHter2片段和ADHpro3片段连接到新的pET21a载体的NotI/XhoI限制性酶切位点上,以得到质粒20。在这种情况下,在P6_R引物的XhoI限制性酶切位点之前添加PmII限制性酶切位点,然后使用所得构建体随后制备

质粒21。

[0115] (8) 通过将使用P7_F引物和P7_R引物从pAUR123载体扩增的DNA片段(ADHter3)连接到先前制备的质粒20的PmlI/XhoI限制性酶切位点来构建质粒21。

[0116] (9) 最后,为了引入mtMRP1基因作为第三个基因,通过将PCR片段(mtMRP1)连接到质粒21的PmlI限制性酶切位点来构建质粒22,该PCR片段(mtMRP1)是使用热带假丝酵母ES5菌株的基因组DNA作为模板并使用P8_F引物和P8_R引物进行扩增的。

[0117] (10) 最后,将先前制备的质粒18和22的限制性片段融合以制备质粒24,质粒24中引入了所有mtLIP1、mtFAT1和mtMRP1基因。然后,通过使用质粒24作为模板并使用P9_F引物和P9_R引物进行PCR并将DNA片段连接到pRS420的BamHI/XhoI限制性酶切位点,来构建质粒25。将构建的质粒25转化到 β -氧化途径缺失的热带假丝酵母20962中,以最终制备热带假丝酵母_mtSAP7菌株。最终的质粒25的构造和所用的限制性内切酶如图15所示。

[0118] 还基于上述方法制备了引入mtLIP1、mtFAT1和mtMRP1基因中的两个基因的热带假丝酵母菌株(mtSAP4(mtLIP1+mtMRP1)、mtSAP5(mtLIP1+mtFAT1)以及mtSAP6(mtMRP1+mtFAT1))。

[0119] 比较了四种突变型热带假丝酵母菌株的OD变化、底物消耗量和癸二酸产量。结果证实,引入了所有三个突变基因的热带假丝酵母mtSAP7菌株具有优异的形成细胞、消耗底物和产生癸二酸的能力(图16、图17和图18)。

[0120] 为了考察三个引入基因的效果,在相同条件下使制备的热带假丝酵母_mtSAP7菌株和 β -氧化途径缺失的热带假丝酵母20962(β -KO)菌株发酵。首先将菌株在补充有100g/L甘油的YP培养基中培养,直到菌株的OD值达到100。培养80小时后,添加200g/L的DAME作为底物,然后于30℃培养250小时。

[0121] 结果,在热带假丝酵母_mtSAP7菌株和用作对照的热带假丝酵母20962菌株(β -氧化途径缺失的菌株)中均未观察到OD值的变化(图19)。比较了两种菌株的SA产量。结果证实,用作对照的菌株在约250小时具有最大的癸二酸产量(约27g/L),而mtSAP7菌株在经过约250小时后产生约110g/L的癸二酸(图19)。

[0122] 基于上述研究,证实了通过全碱基测序获得的三个基因对细胞形成、消耗底物的能力和癸二酸生产力的提高有很大贡献。此外,证实了与本领域已知的工艺相比,通过使用热带假丝酵母_mtSAP7菌株的高细胞密度生物转化工艺,开发了具有优异的癸二酸生产力的工艺。

[0123] [实施例7]热带假丝酵母mtSAP7菌株对FAME底物的耐受性和二羧酸生产的确认

[0124] 另外,利用实施例6-4中制备的热带假丝酵母mtSAP7菌株,考察了该菌株从DAME生产癸二酸以及从各种FAME底物生产二羧酸的能力,然后以与实施例6相同的方式比较了热带假丝酵母mtSAP7菌株与对照菌株的能力。

[0125] 结果,如图20所示,证实了在C₈至C₁₂FAME底物中热带假丝酵母mtSAP7菌株的C₈至C₁₂二羧酸产量显著增加。基于这些结果,证实了本发明的突变型热带假丝酵母mtSAP7菌株对具有细胞毒性的FAME底物表现出强的耐受性,因此当使用FAME作为底物时极大地有助于改善二羧酸生产力(图20)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 高丽大学校产学协力团
- [0003] <120> 用于生产二羧酸的微生物及使用其生产二羧酸的方法
- [0004] <130> G21U13C0485P/CN
- [0005] <150> KR 10-2018-0154372
- [0006] <151> 2018-12-04
- [0007] <160> 34
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 1368
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> *Candida tropicalis*
- [0013] <400> 1
- [0014] atgagatttc ttgtattcat tacaattatt acatggttga aaactgtatc aactgctcat 60
- [0015] attcctgcac cacttgctga tccaagtaga gatgagtttt atactccatc tccaggtttt 120
- [0016] gaatacgtca ctccaggaac tatttttaaaa atccgtccaa ctctctgtgc tgttcgtaat 180
- [0017] ttattattct ttcattgtcc tttaaaaaac tcttggcaat tgttggtttag atctcaagat 240
- [0018] tcttttggtg aacctaatac tatagttact acaattcttg aacctatgaa ttcaaatacct 300
- [0019] tcaaaaattt tatcttatca aacttttgaa gattcaactt cattaaaatg cgctaccagt 360
- [0020] tataattatc aagttggtat tccaccattt ggaaatgttg ctaccaatt tgaaatgaaa 420
- [0021] tttataattc ctgctttaaa taaaggatat tttgtaatta gtcttgatta tgaaggacca 480
- [0022] agaggtgcat ttactgttgg tgcacaagca gcacatgcag tattggattc tttcgtgct 540
- [0023] gtattgaatt ctgggtctat aacttctatt gatccagatg ctaaagttgc aatgtgggg 600
- [0024] tattctggag gatccttagc atcaagttgg gcagctgtaa tgcaacctga atatgcacct 660
- [0025] gaattatcaa ataatttaat aggtgctgcc ttgggaggat ttgttactaa tataactgct 720
- [0026] gttgctgaat attctgatag aactccactt tctggtcttg ttccagtagc acttaatgga 780
- [0027] ttagccaatg aatatccatt ggtagacaa ttgcttaatc aagaaataag tcctaaaaaa 840
- [0028] aatgcaagtt ttcattgttg agttcaaaaa tgttttcttc ctgctatagc ttattttaga 900
- [0029] ggaagaacta ttcttggtag aaataatgaa aagaaagcaa tgtttcctaa tggatggcat 960
- [0030] ttacttgata atcctgattt ttttgaaatt cttgataaaa ataatttgat ttcttataac 1020
- [0031] gcaattccaa aaattccaat atttgtatat catggaacaa aagatggagt tgttccgatt 1080
- [0032] tcctatgctc ataaaatttt cgataaatgg tgtgatgagg gaattgaatc gtttgaattt 1140
- [0033] gcagaatctt taactactgg acatatattg gaaactttta ctggtgctgc agccgcttgg 1200
- [0034] acttggttac aaaaacgatt tgatgatgta cctccatata atggttggtt ccatacaaga 1260
- [0035] agactcacta atttgaagta cacgggagca tcaaagagta taattgatta ttacgatggg 1320
- [0036] ttgtttaaag aaagcttcac tgtgaagaat agtacctatc ttgtctag 1368
- [0037] <210> 2
- [0038] <211> 1953
- [0039] <212> DNA
- [0040] <213> *Candida tropicalis*
- [0041] <400> 2

[0042]	atgtcaggat tagaaattgc tgcagctgcc gttcttggta gtcagttatt agaagccaaa	60
[0043]	tatttaattt ccgatgatgt actgttggcc aaaacagttg ctcttaatgc acttccatat	120
[0044]	ttatggaaag cctccagggg taaagcttca tatttggtatt tctttgaaaa atcagtattt	180
[0045]	aaaaatccaa ataataaagc attggcattt ccaagaccaa gaaagaatgc accaccacca	240
[0046]	aagggtgatg atgaaggatt tcaaatttat gacgatcaat ttgacctaga agaataatcc	300
[0047]	tataaggaat tgtatgacat ggttttgaaa tactcttaca ttttgaaaca tgaatatggg	360
[0048]	gttactgcaa atgatactat tgggtgtttct tgtatgaata aaccactttt cattgtttta	420
[0049]	tggttggcct tatggaatat tgggtgccttg ccagcatttt tgaatttcaa caccaaagat	480
[0050]	aaaccattga ttactgtct taaaattgtc aatgctagtc aagttttcgt tgatcctgat	540
[0051]	tgtgatgctc caatcaaaga tactgaatct caaattaaag aggaattacc acatgttaga	600
[0052]	ataaattaca ttgatgaatt tgctttgttt gatagattaa gactcaagtc tactccaaaa	660
[0053]	tacagagctg aagatagtag tagaagacca acagataccg attcttccgc ctgtgcgttg	720
[0054]	atctatacat caggtaccac tggttttacca aaagcaggta tcatgtcttg gagaaaagca	780
[0055]	ttcatggctt ctgttttctt tggccatatt atgaaaatta agaatgattc caatgtttta	840
[0056]	acagctatgc cattgtatca ttcaacagct gctatgttgg gtttgtgtcc tactttaatt	900
[0057]	gttgggtggt gtgtttctgt ttctcaaaaa ttctcagcca cttcattctg gactcaagct	960
[0058]	agattatgtg gtgccacaca tattcaatat gttggtgaag tttgtcgtta tttgttaa	1020
[0059]	tcaaaacatc acccagatca agatagacac aatgttataa ttgcctatgg taatggatta	1080
[0060]	cgtccagata tatggtctga attcaagaga agattccaca ttgaaggatg tggggaattt	1140
[0061]	tatgcagcta ctgaatctcc aattgccact acaaaactac aatacggatg atatggtgta	1200
[0062]	ggtgcctgtc gtaaatatgg ttacttatt agtttattgt tatctacca acaaaaattg	1260
[0063]	gccaagatgg atccagaaga tgaaagtga atttataagg atccaaaaac tggattttgt	1320
[0064]	gttgaagctg catataatga acctggtgaa ttgttgatga gaattttaaa tccta	1380
[0065]	attcaaaaat cattccaagg ttattatggg aacaaatctg ctaccaatag caaaattctc	1440
[0066]	acgaatgtt tcaaaaaagg agatgcttgg tatagaagtg gtgacttgtt gaaaatggat	1500
[0067]	gaacatcaat tgttgtattt tgttgataga ttgggtgata ccttccgttg gaaatcagaa	1560
[0068]	aatgtttcag caactgaagt tgaaaatgag ttgatgggat ctaaagcatt gaaacaatct	1620
[0069]	gttgttgttg gtgttaaagt tccaaatcac gaaggtagag cttgttttgc tgtatgtgaa	1680
[0070]	gcaaaagatg atttaactca tgaagatatt ttgaaattga ttcatggaca tgttactaaa	1740
[0071]	tcgttaccag tttatgcaca acctgcattc attaaaatcg gatccattga agcttctcat	1800
[0072]	aatcataaag ttccaaagaa tcaatttaag aatcaaaaat taccaaaagg tgaagatgg	1860
[0073]	aaagacttga tttactgggt gaatgggtgat aaatatcaag agttgactga agaggattgg	1920
[0074]	tctttgatct gtactggtaa agccaaattg taa	1953
[0075]	<210>	3
[0076]	<211>	4455
[0077]	<212>	DNA
[0078]	<213>	Candida tropicalis
[0079]	<400>	3
[0080]	atgggagaaa taacccaac tgacaaaagc gaagaccagt caatggttaa tgcatatcat	60
[0081]	ggatttgata ctcatgcatc agaagatata caagatttag ccaaaacttt tactcatcat	120
[0082]	tcaattggcg atggtactga tggttttacaa agatatctta caaatatgac agaagtacca	180
[0083]	ggtataaate cttacaccga agatatattac actagtgacc aattgaatcc agactcagat	240

[0084]	aattttaatg caaagttttg gatcaagaac ttgagaaaat tgtatgattc agatccagat	300
[0085]	tattacaagc catcaagatt gggagttgcc tatagagatt taagagctta tgggtgtggc	360
[0086]	aatgattctg attaccagcc cactgtggca aacgcggtct ggaagtttat caaagaggga	420
[0087]	ttgcattatt tagaaaaagg tgatggctca aggtattttg atattttaaa atcaatggat	480
[0088]	ggaataatga aaccagggtga acttacagtt gttttaggta gaccaggggc tggttgttcc	540
[0089]	acattgttga aaacattggc ttcacaaaca tatggatttc atattggaaa agaatacaaa	600
[0090]	atcagttatg atggtttaac tcctcccgaa atcgaaaaaa cttatagggg taatgttgta	660
[0091]	tactctgcag aaacagatgt tcattttcca catttgactg tcggacaagt cttggaattt	720
[0092]	gctgctagaa tgagaacgcc acagaacaga ggtgaagggt tagatagaga aacatatgcc	780
[0093]	aaacaccttg ctagtgttta tatggctact tatgggttat ctcatacaag aaataccaat	840
[0094]	gtgggtaacg attttgcag aggagtttct ggtgggtgaaa gaaaaagggt ctccattgct	900
[0095]	gaagtttcgt tgagtgggtc aaatgttcaa tgttgggata atgccactag aggtttggat	960
[0096]	gctgcaaccg cattggaatt catcagagca ttgaagactt ctgctgctat tttggaaagt	1020
[0097]	acccattga ttgctattta tcaatgttca caagatgctt atgacttgtt tgataatgtt	1080
[0098]	gtcgttttgt atgaaggttt ccaaattttt tttggtaaag ccaataaagc caaggagtat	1140
[0099]	tttgtaaaca tgggatacaa gtgtcctcaa agacaaacca ctgctgactt ttttaacttca	1200
[0100]	ttgactaatc cagctgaaag agagccatta ccaggttatg agaataaagt cccaaggact	1260
[0101]	cctcaagaat ttgaagcata ttggaagaaa tccccagagt atactgcatt ggttaatgaa	1320
[0102]	attgattcat atttcattga gtgtgagaaa ttaaaccacca gacaactcta ccaagattca	1380
[0103]	catgttgcaa gacaatccaa caatattcgt ccattctcac catatactgt atcatttttc	1440
[0104]	atgcaagtaa agtatgttat acaaagaaat ttctccgta tgaaagctga tccatcgatt	1500
[0105]	ccgttgacta ctattttctc acaactagtt atgggactta ttcttgccctc ggtattttac	1560
[0106]	aatcttctcg caacttcagg ttctttttac taccgatccg gtgcgcttta ctttggtttg	1620
[0107]	ttatttaatg ctatttcgtc cctacttgaa attattgccc tttttgaagc aagaccatt	1680
[0108]	gttgagaaac ataaaaata tgccctttat cgtccatcag cagatgcatt agcaagtatt	1740
[0109]	ataagtgagt taccagttaa gttttttcaa tccttggtgt tcaacattcc tttctatttt	1800
[0110]	atggttaacc ttagaagaga tgctggtaga ttcttctttt attggttaat tggatatatta	1860
[0111]	ggtacattca ttatgtcaca cttattcaga tctattgggtg cagtatttac tacttttagca	1920
[0112]	ggtgctatga ctccggcggg ggtgatttta ttagcaatga tattatttgc tggatttgtc	1980
[0113]	attccatttc caagcatgtt gggttggtct aaatggataa aatggataaa tcctgtcact	2040
[0114]	tatttgtttg aatcacttat ggtaaacgag tatcataata gagagtttga atgcagtgat	2100
[0115]	ttcgtaccta tgggaccagg atatgagaat cttagtcttg aaaataaggt ttgttcaagt	2160
[0116]	ttgggtggca tccttggttag tgcttttgtt caagggtgatg attatttaag acttggattt	2220
[0117]	gccttttcta actcccataa gtggagaaat tttggtatat ctgttgcggt tgctgtgttt	2280
[0118]	cttttgtttc tttatgttgc attgactgaa ctcaataaag gtgctatgca aaaagggtgaa	2340
[0119]	attgtgttgt ttcttagagg atctttgaag aaatacaaga gaaactccag tagcgcagat	2400
[0120]	attgaatccg gtaaagaaat agtgaaattt aatttccaag acgaagcaga atcttcta	2460
[0121]	agtatcgta ttgatgaaaa gggttctacg ggcagtgaag aattactacc agacaacaga	2520
[0122]	gaaattttct tttggaagaa tttgacatat caagtcaaga ttaagaaaga agatagagtc	2580
[0123]	attttagacc atgttgatgg ttgggttaaa ccagggtcaa ttactgcatt gatgggtgca	2640
[0124]	tctggtgctg gtaagaccac tttgttgaat tgtttatctg agagagtaac tactggtgtt	2700
[0125]	attactgatg gtgtgagaat ggttaatgggt catgcgtagg attcttcggt ccaagatca	2760

[0126]	attggttatg tgcaacaaca agatgttcat ttacagacat ctacagttag agaagcgttg	2820
[0127]	caattctccg catatttgag acaatcaaac aaaatatcta agaaggagaa ggatgaatat	2880
[0128]	gttgactacg tcattgactt gttggagatg actaactatg cggatgcatt ggttggtgtt	2940
[0129]	gccggtgaag gtttgaatgt tgaacaaaga aagagattaa ccatcgggtg tgaattagtt	3000
[0130]	gccaaagccta agttgttact attccttgat gaaccaactt ctggtttaga ctcccaaact	3060
[0131]	gcctggtcta tttgtaagtt gatgagaaag ttagctgac atggtcaagc tatcttgtgt	3120
[0132]	acaattcatc aaccttccgc acttattatg gctgaattcg atagattgtt gtttttgcaa	3180
[0133]	aagggtggtg gaactgctta ttttggtgac ttgggtaaaa actgtcaaac catgattgac	3240
[0134]	tactttgaaa aacacggagc agatccatgt cccaaagaag ccaatccagc agaatggatg	3300
[0135]	ttggaagtgt ttggtgccgc tccaggctcc catgctaaac aggactatit tgaagtttgg	3360
[0136]	agaaactctg acgaatatag agctgttcaa aatgaaatca cccatatgga aactgaatta	3420
[0137]	gttaaattac caagagatga agatcccga gcaacttttg aatacgtgc acccatttgg	3480
[0138]	aaacaatatt tgcttgtag ttggaggcg attgtacaag attggagatc acctggatat	3540
[0139]	atatactcca aatttttctt gattatcgtg tcatctatat tgattggatt ttcatttttt	3600
[0140]	aaagccaaaa atacagttca agggttgacg aatcaaagc ttgctatatt tatgttcaca	3660
[0141]	gttcaattca caactattat tgaccaaatg ttgccatttt ttgttcgaca acgtgaggtg	3720
[0142]	tatgaggtta gagaagcacc ttccagaaca tatagttggg ttgccttcat tacaggtcaa	3780
[0143]	ataacttcag agcttcctta tcaataaatt gttggaacga ttgctttctt ctgctgtgac	3840
[0144]	tatcctgttg gattatatac caatgctgaa cctacacata gtgtgactga acgtggtgcc	3900
[0145]	ttgatgtggt tgtttattac ttcatttttt gtttacacat caacatttgg tcaattatgt	3960
[0146]	atgtcattca atgaagatat tgaatatgct ggaactgttg ctgctacatt attcaccttg	4020
[0147]	tgtttgatat tttgtggtgt tatggttgtt ccagagaata tgccacgatt ttggattttc	4080
[0148]	atgtacagat gtaatccatt tacttatatg attcaagggt tcttttcaac gggattagct	4140
[0149]	cgcaataaag ttgtttgtgc tgcaagagaa cttgttctgc ttcaaccacc aaaaggtcaa	4200
[0150]	acttgttctt cattcttga tccctatatac agtgtggctg gaggttatta ttacctaata	4260
[0151]	aatgatggaa cttgttcatt ctgttcagta gataatactg atatgttttt acatcgtatc	4320
[0152]	catgccttat acagtgagag atggagaaat tttggattat ttattacatt cattgtgatt	4380
[0153]	aatgttgtct tgactgtatt cttttatttg ttagctaggg taccaaaagg gtcaagatca	4440
[0154]	aagactaaaa agtga	4455
[0155]	<210>	4
[0156]	<211>	1372
[0157]	<212>	DNA
[0158]	<213>	Candida tropicalis
[0159]	<400>	4
[0160]	aagagatttc ttgtattcat tacaattatt acatggttga aaactgtatc aactgctcat	60
[0161]	attcctgcac cacttgctga tccaagtaga gatgagtttt atactccatc tccaggtttt	120
[0162]	gaatacgtc ctccaggaac tattttaaaa atccgtccaa ctctcgtgc tgttcgtaat	180
[0163]	ttattattct ttcattgtcc tttaaaaaac tcttggcaat tgttggttag atctcaagat	240
[0164]	tcttttggtg aacctaatgc tatagttact acaattcttg aacctatgaa ttcaaactct	300
[0165]	tcaaaaattt tatcttatca aacttttgaa gattcaactt cattaaaatg cgctaccagt	360
[0166]	tataattatc aagttggtat tccaccattt ggaaatgttg ctaccaatg tgaaatgaaa	420
[0167]	tttataattc ctgctttaaa taaaggatat tttgtaatta gtctgatta tgaaggacca	480

[0168] agaggtgcat ttactgttgg tgcacaagca gcacatgcag tattggattc tattcgtgct 540
 [0169] gtattgaatt ctgggtctat aacttctatt gatccagatg ctaaagttgc aatgtggggt 600
 [0170] tattctggag gatccttagc atcaagttgg gcagctgtaa tgcaacctga atatgcacct 660
 [0171] gaattgtcaa ataatttaat aggtgttgcc ttggggagga ttgtttacta atataactgc 720
 [0172] tgttgctgaa tattctgata gaactccact ttctggctctt gttccagtag cacttaatgg 780
 [0173] attagccaat gaatatccat tggtttagaca attgcttaat caagaaataa gtcctaaaaa 840
 [0174] aaatgcaagt ttatcatcgtg gagttcaaaa atgttttctt cctgctatag cttatttttag 900
 [0175] aggaagaact attcttggta gaaataatga aaagaaagca atgtttccta atggatggca 960
 [0176] ttactttgat aatcccggat ttttttgaaa ttcttgataa aaataatttg atttcttata 1020
 [0177] acgcaattcc aaaaattcca atatttgtat atcatggaac aaaaaagatg gagttgttcc 1080
 [0178] gatttcctat gtcataaaaa ttttcgataa atgggtgtgat gaggaattg aatcgtttga 1140
 [0179] atttgcagaa tctttaacta ctggacatat attggaaact ttactgggtg ctgcagccgc 1200
 [0180] ttggacttgg ttacaaaaac gatttgatga tgtacctcca tataatggtt gtttcctac 1260
 [0181] aagaagactc actaatttga agtacacggg agcatcaaag agtataattg attattacga 1320
 [0182] tgggttgttt aaagaaagct tcaactgtgaa gaatagtacc tatcttgtct ag 1372
 [0183] <210> 5
 [0184] <211> 1960
 [0185] <212> DNA
 [0186] <213> *Candida tropicalis*
 [0187] <400> 5
 [0188] atgtcaggat tagaaattgc tgcagctgcc gttcttggta gtcagttatt agaagccaaa 60
 [0189] tatttaattt ccgatgatgt actgttggcc aaaacagttg ctcttaatgc acttccatat 120
 [0190] ttatggaaag cctccagggg taaagcttca tatttgtatt tctttgaaaa atcagtattt 180
 [0191] aaaaatccaa ataataaagc attggcattt ccaagaccaa gaaagaatgc accaccacca 240
 [0192] aaggttgatg atgaaggatt tcaaatttat gacgatcaat ttgacctaga agaataatcc 300
 [0193] tataaggaat tgtatgacat ggttttgaaa tactcttaca ttttgaaaca tgaatatggt 360
 [0194] gttactgcaa atgatactat tgggtgttct tgtatgaata aaccactttt cattgtttta 420
 [0195] tggttggcct tatggaatat tgggtgccttg ccagcatttt tgaatttcaa caccaaagat 480
 [0196] aaaccattga ttactgtct taaaattgtc aatgctagtc aagttttcgt tgatcctgat 540
 [0197] tgtgatgctc caatcaaaga tactgaatct caaattaaag aggaattacc acatgttaga 600
 [0198] ataaattaca ttgatgaatt tgctttgtat tgatagatta agactcaagt ctactccaaa 660
 [0199] atacagagct gaagatagta ctagaagacc aacagatacc gattcttccg cctgtgcgtt 720
 [0200] gatctataca tcaggtacca ctggtttacc aaaagcaggt atcatgtctt ggagaaaagc 780
 [0201] attcatggct tctgtttcct ttggccatat tatgaaaatt aagaatgatt ccaatgtttt 840
 [0202] tacagttatg ccattgtatc attcaacagc tgctatgttg ggtttgtgtc ctactttaat 900
 [0203] tgttggtggt tgtgtttctg tttctcaaaa attctcagcc acttcattct ggactcaagc 960
 [0204] tagattatgt ggtgccacac atattcaata tgttgggtgaa gtttgtcgtt atttgttaaa 1020
 [0205] ctcaaaacat caccagatc aagatagaca caatgttaaa attgcctatg gtaatggatt 1080
 [0206] acgtccagat atatggtctg aattcaagag aagattccac attgaaggta ttggggaatt 1140
 [0207] ttatgcagct actgaatctc caattgccac tacaactta caatacgggt aatatggtgt 1200
 [0208] aggtgcctgt cgtaaatatg gttcacttac tagtttattg ttatctaccc aacaaaaatt 1260
 [0209] ggccaagatg gatccagaag atgaaagtga aatttataag gatccaaaaa ctggattttg 1320

[0210]	tgttgaagct gcatataatg aacctgggtga attgttgatg agaattttaa atcctaataga	1380
[0211]	tattcaaaaa tcattccaag gttattatgg taacaaatct gctaccaata gcaaaattct	1440
[0212]	cacgaatgtt ttcaaaaaag gagatgcttg gtatagaagt ggtgacttgt tgaaaatgga	1500
[0213]	tgaacatcaa ttgttgatt ttgttgatag attgggtgag aaataccttc cgttggaaat	1560
[0214]	cagaaaatgt ttcagcaact gaagttgaaa atgagttgat gggatctaaa gcattgaaac	1620
[0215]	aatctgttgt tgttgggtgt aaagttccag gaatcacgaa ggtagagctt gttttgctgt	1680
[0216]	atgtgaagca aaagatgatt taactcatga agatattttg aaattgattc atggacatgt	1740
[0217]	tactaaatcg ttaccagttt atgcacaacc tgcattcatt aaaatcggat ccattgaagc	1800
[0218]	ttctcataat cataaagttc caaagaatca atttaagaat caaaaattac caaaaggtga	1860
[0219]	agatggtaaa gacttgattt actggttgaa tgggtgataaa tatcaagagt tgactgaaga	1920
[0220]	ggattgggtct ttgatctgta ctggtaaagc caaattgtaa	1960
[0221]	<210> 6	
[0222]	<211> 4455	
[0223]	<212> DNA	
[0224]	<213> Candida tropicalis	
[0225]	<400> 6	
[0226]	atgggagaaa taacccaac tgacaaaagc gaagaccagt caatgggtta tgcatatcat	60
[0227]	ggatttgata ctcatgcac agaagatata caagatttag ccaaaacttt tactcatcat	120
[0228]	tcaattggcg atggtactga tggtttaca agatatctta caaatatgac agaagtacca	180
[0229]	ggtataaatc cttacaccga agatatttac actagtacc aattgaatcc agactcagat	240
[0230]	aattttaatg caaagtttg gatcaagaac ttgagaaaat tgtatgattc agatccagat	300
[0231]	tattacaagc catcaagatt gggagttgcc tatagagatt taagagctta tgggtgtggc	360
[0232]	aatgattctg attaccagcc cactgtggca aacgcggtct ggaagtttat caaagaggga	420
[0233]	ttgcattatt tagaaaaagg tgatggctca aggtattttg atattttaaa atcaatggat	480
[0234]	ggaataatga aaccaggtga acttacagtt gttttaggta gaccaggggc tggttgttcc	540
[0235]	acattgttga aaacattggc ttcacaaaca tatggatttc atattgaaa agaatacaaa	600
[0236]	atcagttatg atggtttaac tcctccgaa atcgaaaaa cttatagggg taatgttgta	660
[0237]	tactctgcag aaacagatgt tcatthcca catttgactg tcgacaagt cttggaattt	720
[0238]	gctgctagaa tgagaacgcc acagaacaga ggtgaagtg tagatagaga aacatatgcc	780
[0239]	aaacaccatg ttagtgttta tatggctact tatgggttat ctcatacaag aaataccaat	840
[0240]	gtgggtaacg atttgtcag aggagtttct ggtggtgaaa gaaaaagggt ctccattgct	900
[0241]	gaagtttcgt tgagtgggtc aaacgttcaa tgttgggata atgccactaa aggtttggat	960
[0242]	gctgcaaccg cattggaatt catcagagca ttgaagactt ctgctgctat tttggaaagt	1020
[0243]	acccattga ttgctactta tcaatgttca caagatgctt atgacttgta tgataatgct	1080
[0244]	gtcgttttgt atgaaggttt ccaattttt tttggttaaag ccaataaagc caaggagtat	1140
[0245]	tttgtaaaca tgggatacaa gtgtcctcat agacaaaaca ctgctgactt tttaacttca	1200
[0246]	ttgactaatc cagctgaaag agagccatta ccaggttatg agaataaagt cccaaggact	1260
[0247]	cctcaagaat ttgaagcata ttggaagaaa tccccagagt atactgcatt ggttaatgaa	1320
[0248]	attcattcat atttcattga gtgtgagaaa ttaaaccacca gacaactcta ccaagattca	1380
[0249]	catgttgcaa gacaatccaa caatattcgt ccatcttcac catatactgt atcatttttc	1440
[0250]	atgcaagtaa agtatgttat acaaagaaat ttcctccgta tgaaagctga tccatcgatt	1500
[0251]	ccgttgacta ctattttctc acaactagtt atgggactta ttcttgctc ggtattttac	1560

[0252]	aatcttcctg caacttcagg ttctttttac taccgatccg gtgcgcttta ctttggtttg	1620
[0253]	ttatttaaatg ctatttcgtc cctacttgaa attattgccc tttttgaagc aagacccatt	1680
[0254]	gttgagaaac ataaaaaata tgccctttat cgtccatcag cagatgcatt agcaagtatt	1740
[0255]	ataagtgagt taccagttaa gttttttcaa tccttgtgtt tcaacattcc tttctatttt	1800
[0256]	atgggtaacc ttagaagaga tgctggtaga ttcttctttt attgggtaat tggatatatta	1860
[0257]	ggtacattca ttatgtcaca cttattcaga tctattgggtg cagtatttac tacttttagca	1920
[0258]	ggtgctatga ctccggcggg ggtgatttta ttagcaatga tattatttgc tggatttgtc	1980
[0259]	attccatttc caagcatgtt ggggttggtct aaatggataa aatggataaa tcctgtcact	2040
[0260]	tatttgtttg aatcacttat ggtaaacgag tatcataata gagagttaga atgcagtgat	2100
[0261]	ttcgtaccta tgggaccagg atatgagaat cttagtcttg aaaataaggt ttgttcaagt	2160
[0262]	ttgggtggca tccctggtag tgcttttgtt caagggtatg attatttaag acttggattt	2220
[0263]	gccttttcta actcccataa gtggagaaat tttggtatat ctgttgctgt tgcgtgtgtt	2280
[0264]	cttttgtttc tttatgttgc attgactgaa ctcaataaag gtgctatgca aaaaggtgaa	2340
[0265]	attgtgttgt ttcttagagg atctttgaag aaatacaaga gaaactccag tagcgcagat	2400
[0266]	attgaatccg gtaaagaaat agtgaaattt aatttccaag acgaagcaga atcttcta	2460
[0267]	agtatcgta ttgatgaaaa gggttctacg ggcagtgaag aattactacc agacaacaga	2520
[0268]	gaaattttct tttggaagaa ttgacatat caagtcaaga ttaagaaaga agatagagtc	2580
[0269]	atttagacc atgttgatgg ttgggttaaa ccagggtcaa ttactgcatt gatgggtgca	2640
[0270]	tctgggtctg gtaagaccac tttgttgaat tgtttatctg agagagtaac tactgggtgt	2700
[0271]	attactgatg gtgtgagaat ggtaaatggc catgcgttag attcttcgtt ccaaagatca	2760
[0272]	attggttatg tgcaacaaca agatgttcat ttacagacat ctacagttag agaagcgttg	2820
[0273]	caattctccg catatttgag acaatcaaac aaaatatcta agaaggagaa ggatgaatat	2880
[0274]	gttgactacg tcattgactt gttggagatg actaactatg cggatgcatt ggttgggtgt	2940
[0275]	gccggtgaag gtttgaatgt tgaacaaaga aagagattaa ccatcggtgt tgaattagtt	3000
[0276]	gccaaagccta agttgttact attcttggat gaaccaactt ctggttttaga ctcccact	3060
[0277]	gcctgttcta tttgtaagtt gatgagaaag ttagctgac atgggtcaagc tatcttgtgt	3120
[0278]	acaattcatc aacctccgc acttattatg gctgaattcg atagattgtt gtttttgcaa	3180
[0279]	aagggtggtg gaactgctta ttttgggtgac ttgggtaaaa actgtcaaac catgattgac	3240
[0280]	tactttgaaa aacacggagc agatccatgt cccaaagaag ccaatccagc agaatggatg	3300
[0281]	ttggaagttg ttggtgccgc tccaggtcc catgctaaac aggactattt tgaagtttgg	3360
[0282]	agaaactctg acgaatatag agctgttcaa aatgaaatca cccatatgga aactgaatta	3420
[0283]	gttaaattac caagagatga agatcccga gcacttttga aatacgtgc acccatttgg	3480
[0284]	aaacaatatt tgcttgttag ttggagggcg attgtacaag attggagatc acctggatat	3540
[0285]	atatactcca aatttttctt gattatcgtg tcatctatat tgattggatt ttcatTTTTT	3600
[0286]	aaagccaaaa atacagttca agggttgacg aatcaaatgc ttgctatatt tatgttcaca	3660
[0287]	gttcaattca caactattat tgaccaaatg ttgccatttt ttgttcgaca acgtgaggtg	3720
[0288]	tatgagggtg gagaagcacc ttccagaaca tatagttggg ttgccttcat tacaggtcaa	3780
[0289]	ataacttcag agcttcctta tcaataaatt gttggaacga ttgctttctt ctgctggtac	3840
[0290]	tatcctgttg gattatatac caatgtgaa cctacacata gtgtgactga acgtgggtgc	3900
[0291]	ttgatgtggg tgtttattac ttcatTTTTT gtttacacat caacatttgg tcaattatgt	3960
[0292]	atgtcattca atgaagatat tgaaaatgct ggaactgttg ctgctacatt attcaccttg	4020
[0293]	tgtttgatat tttgtgggtg tatggttgtt ccagagaata tgccacgatt ttggattttc	4080

[0294] atgtacagat gtaatccatt tacttatatg attcaagggtg ttctttcaac gggatttagct 4140
[0295] cgcaataaag ttgtttgtgc tgcaagagaa cttgtttctgc ttcaaccacc aaaaggtcaa 4200
[0296] acttgttctt cattcttga tccttatatc agtgtggctg gaggttatta ttacctaata 4260
[0297] aatgatggaa cttgttcatt ctgttcagta gataatactg atatgttttt acatcgtatc 4320
[0298] catgccctat acagtgagag atggagaaat ttggattat ttattacatt cattgtgatt 4380
[0299] aatgttgtct tgactgtatt cttttattgg ttagctaggg taccaaaagg gtcaagatca 4440
[0300] aagactaaaa agtga 4455
[0301] <210> 7
[0302] <211> 31
[0303] <212> DNA
[0304] <213> Artificial Sequence
[0305] <220>
[0306] <223> ADHpro_F
[0307] <400> 7
[0308] aaactcgagt ctagctccct aacatgtagg t 31
[0309] <210> 8
[0310] <211> 35
[0311] <212> DNA
[0312] <213> Artificial Sequence
[0313] <220>
[0314] <223> ADHpro_R
[0315] <400> 8
[0316] aaagtcgaca gttgattgta tgcttggtat agctt 35
[0317] <210> 9
[0318] <211> 46
[0319] <212> DNA
[0320] <213> Artificial Sequence
[0321] <220>
[0322] <223> ADHter_F
[0323] <400> 9
[0324] aaagtcgact ctagataagc gaatttctta tgatttatga ttttta 46
[0325] <210> 10
[0326] <211> 34
[0327] <212> DNA
[0328] <213> Artificial Sequence
[0329] <220>
[0330] <223> ADHter_R
[0331] <400> 10
[0332] aaagcgccg cgtgtggaag aacgattaca acag 34
[0333] <210> 11
[0334] <211> 53
[0335] <212> DNA

[0336] <213> Artificial Sequence
[0337] <220>
[0338] <223> LIP1_F
[0339] <400> 11
[0340] aaagtcgaca tgagatttct tgtattcatt acaattatta catggttgaa aac 53
[0341] <210> 12
[0342] <211> 61
[0343] <212> DNA
[0344] <213> Artificial Sequence
[0345] <220>
[0346] <223> LIP1_R
[0347] <400> 12
[0348] aaatctagag tgggtggtggt ggtggtggac aagataggta ctattcttca cagtgaagct 60
[0349] t 61
[0350] <210> 13
[0351] <211> 39
[0352] <212> DNA
[0353] <213> Artificial Sequence
[0354] <220>
[0355] <223> FAT1_F
[0356] <400> 13
[0357] aaagtcgaca tgtcaggatt agaaattgct gcagctgcc 39
[0358] <210> 14
[0359] <211> 42
[0360] <212> DNA
[0361] <213> Artificial Sequence
[0362] <220>
[0363] <223> FAT1_R
[0364] <400> 14
[0365] aaatctagac aatttggett taccagtaca gatcaaagac ca 42
[0366] <210> 15
[0367] <211> 40
[0368] <212> DNA
[0369] <213> Artificial Sequence
[0370] <220>
[0371] <223> MRP1_F
[0372] <400> 15
[0373] aaagtcgaca tgggagaaat aaccccaact gacaaaagcg 40
[0374] <210> 16
[0375] <211> 36
[0376] <212> DNA
[0377] <213> Artificial Sequence

[0378] <220>
[0379] <223> MRP1_R
[0380] <400> 16
[0381] aaatctagac tttttagtct tgaccctttt ggtacc 36
[0382] <210> 17
[0383] <211> 31
[0384] <212> DNA
[0385] <213> Artificial Sequence
[0386] <220>
[0387] <223> P1_F
[0388] <400> 17
[0389] aaaggatcct ctagctccct aacatgtagg t 31
[0390] <210> 18
[0391] <211> 35
[0392] <212> DNA
[0393] <213> Artificial Sequence
[0394] <220>
[0395] <223> P1_R
[0396] <400> 18
[0397] aaagtcgaca gttgattgta tgcttggtat agctt 35
[0398] <210> 19
[0399] <211> 37
[0400] <212> DNA
[0401] <213> Artificial Sequence
[0402] <220>
[0403] <223> P2_F
[0404] <400> 19
[0405] aaagtcgacc acgtgtctag ctccctaaca tgtaggt 37
[0406] <210> 20
[0407] <211> 37
[0408] <212> DNA
[0409] <213> Artificial Sequence
[0410] <220>
[0411] <223> P2_R
[0412] <400> 20
[0413] aaagcggccg cagttgattg tatgcttggt atagctt 37
[0414] <210> 21
[0415] <211> 40
[0416] <212> DNA
[0417] <213> Artificial Sequence
[0418] <220>
[0419] <223> P3_F

- [0420] <400> 21
- [0421] aaagtcgact aagcgaattt cttatgattt atgattttta 40
- [0422] <210> 22
- [0423] <211> 32
- [0424] <212> DNA
- [0425] <213> Artificial Sequence
- [0426] <220>
- [0427] <223> P3_R
- [0428] <400> 22
- [0429] aaacacgtgg tgtggaagaa cgattacaac ag 32
- [0430] <210> 23
- [0431] <211> 59
- [0432] <212> DNA
- [0433] <213> Artificial Sequence
- [0434] <220>
- [0435] <223> P4_F
- [0436] <400> 23
- [0437] cagttgattg tatgcttggt atagtcgaca tgagatttct tgtattcatt acaattatt 59
- [0438] <210> 24
- [0439] <211> 54
- [0440] <212> DNA
- [0441] <213> Artificial Sequence
- [0442] <220>
- [0443] <223> P4_R
- [0444] <400> 24
- [0445] gttaactaag cgaatttctt atgatttatg tcgacagtgg tgggtggtggt ggtg 54
- [0446] <210> 25
- [0447] <211> 56
- [0448] <212> DNA
- [0449] <213> Artificial Sequence
- [0450] <220>
- [0451] <223> P5_F
- [0452] <400> 25
- [0453] cagttgattg tatgcttggt atagcgggcc gcatgtcagg attagaaatt gctgca 56
- [0454] <210> 26
- [0455] <211> 61
- [0456] <212> DNA
- [0457] <213> Artificial Sequence
- [0458] <220>
- [0459] <223> P5_R
- [0460] <400> 26
- [0461] gttaactaag cgaatttctt atgatttatg cggccgcaca atttgcttt accagtacag 60

[0462] a 61
[0463] <210> 27
[0464] <211> 43
[0465] <212> DNA
[0466] <213> Artificial Sequence
[0467] <220>
[0468] <223> P6_F
[0469] <400> 27
[0470] aaagcggccg cataagcgaa tttcttatga tttatgattt tta 43
[0471] <210> 28
[0472] <211> 41
[0473] <212> DNA
[0474] <213> Artificial Sequence
[0475] <220>
[0476] <223> P6_R
[0477] <400> 28
[0478] aaactcgagc acgtgagttg attgtatgct tggatatagct t 41
[0479] <210> 29
[0480] <211> 40
[0481] <212> DNA
[0482] <213> Artificial Sequence
[0483] <220>
[0484] <223> P7_F
[0485] <400> 29
[0486] aaacacgtgt aagcgaattt cttatgattt atgattttta 40
[0487] <210> 30
[0488] <211> 32
[0489] <212> DNA
[0490] <213> Artificial Sequence
[0491] <220>
[0492] <223> P7_R
[0493] <400> 30
[0494] aaactcgagg tgtggaagaa cgattacaac ag 32
[0495] <210> 31
[0496] <211> 52
[0497] <212> DNA
[0498] <213> Artificial Sequence
[0499] <220>
[0500] <223> P8_F
[0501] <400> 31
[0502] cagttgattg tatgcttggt atagcacgtg atgggagaaa taacccaac tg 52
[0503] <210> 32

[0504] <211> 59
[0505] <212> DNA
[0506] <213> Artificial Sequence
[0507] <220>
[0508] <223> P8_R
[0509] <400> 32
[0510] gttaactaag cgaatttctt atgatttaca cgtgcttttt agtcttgacc cttttggta 59
[0511] <210> 33
[0512] <211> 56
[0513] <212> DNA
[0514] <213> Artificial Sequence
[0515] <220>
[0516] <223> P9_F
[0517] <400> 33
[0518] gcttgatatac gaattcctgc agcccggggg atcctctagc tccctaacat gtaggt 56
[0519] <210> 34
[0520] <211> 55
[0521] <212> DNA
[0522] <213> Artificial Sequence
[0523] <220>
[0524] <223> P9_R
[0525] <400> 34
[0526] ggggggcccg gtaccaatt cgccctctcg aggtgtggaa gaacgattac aacag 55

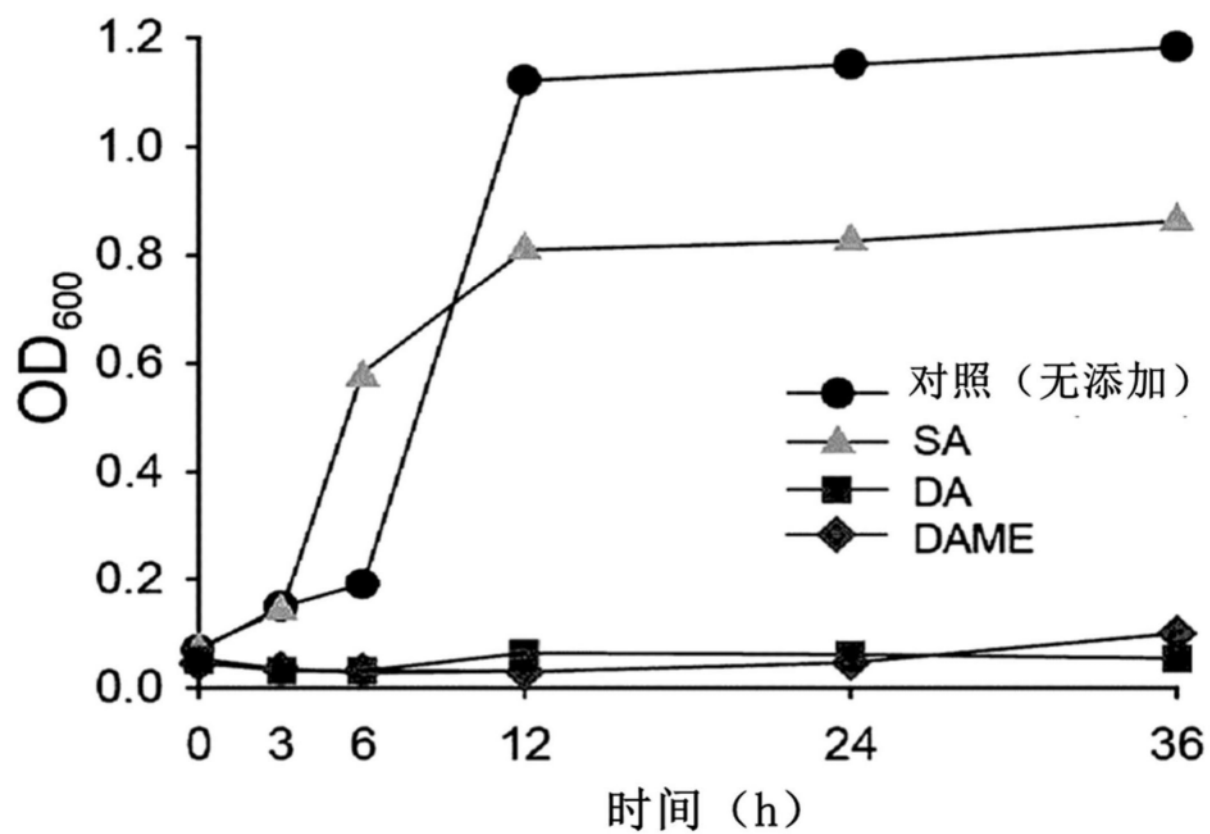


图1

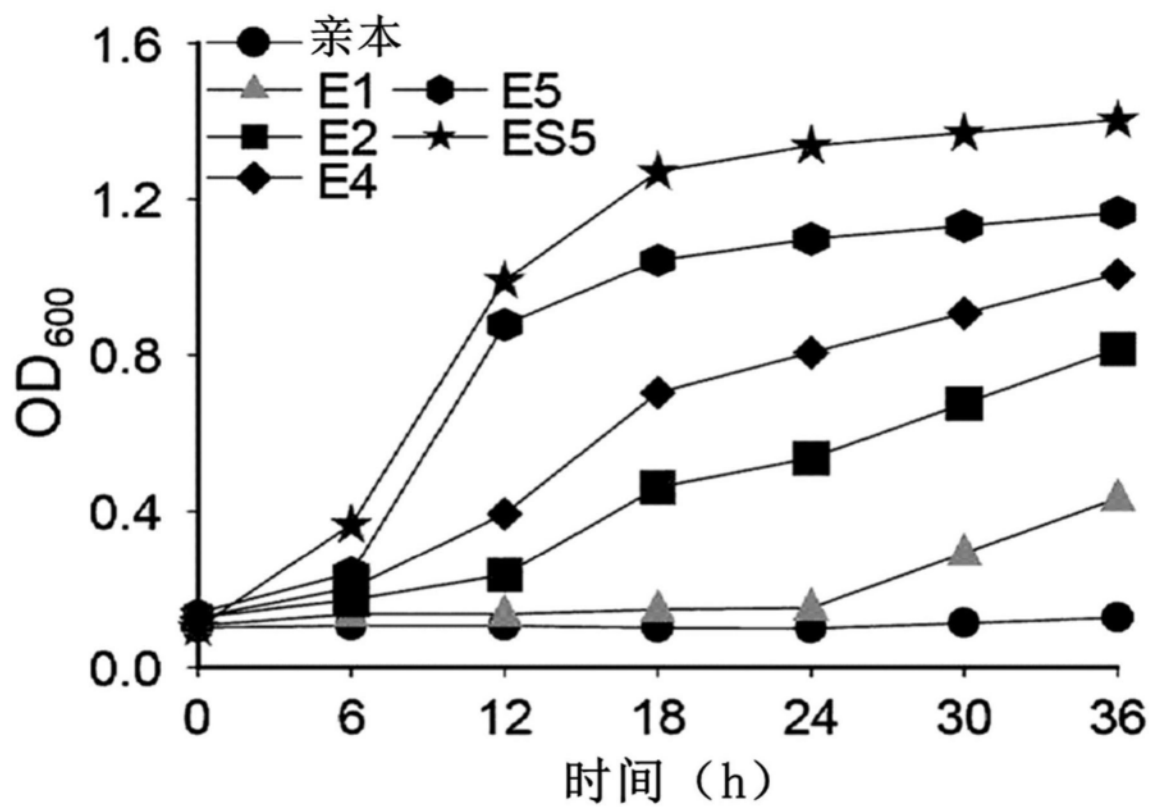


图2

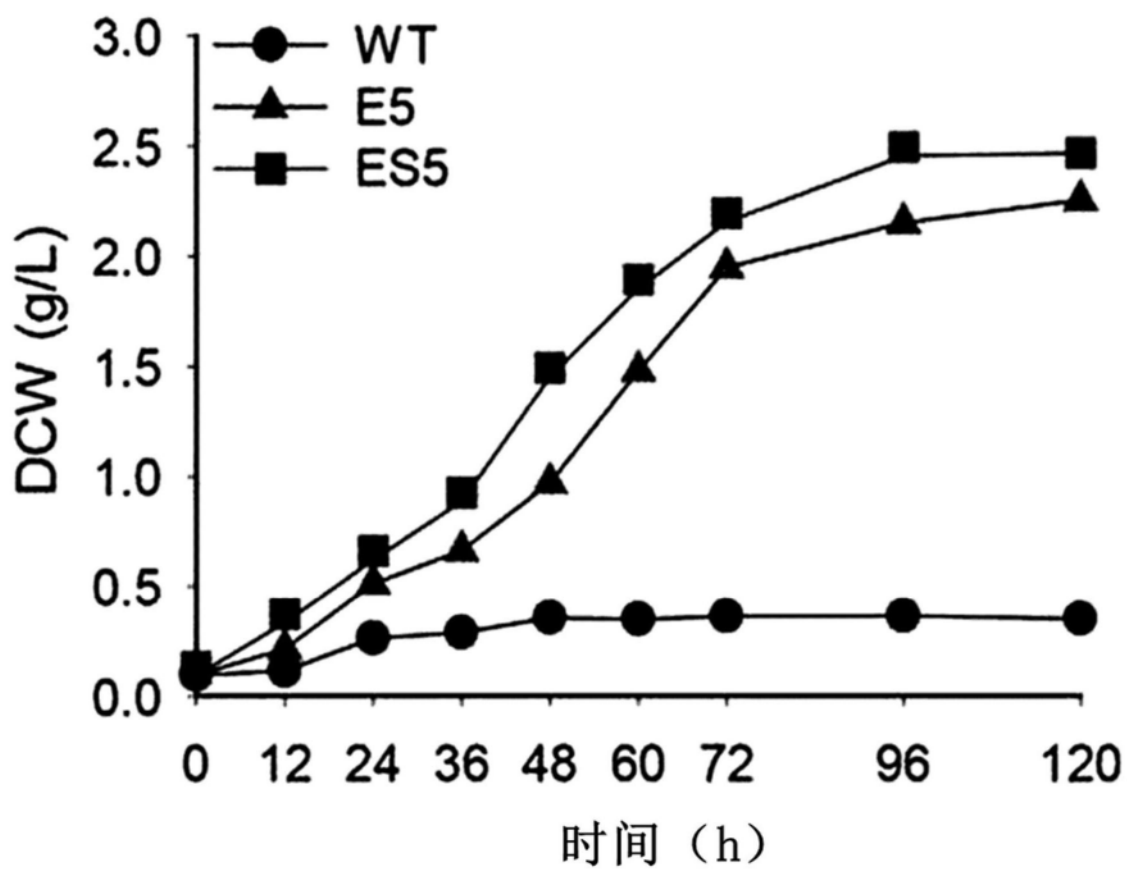


图3

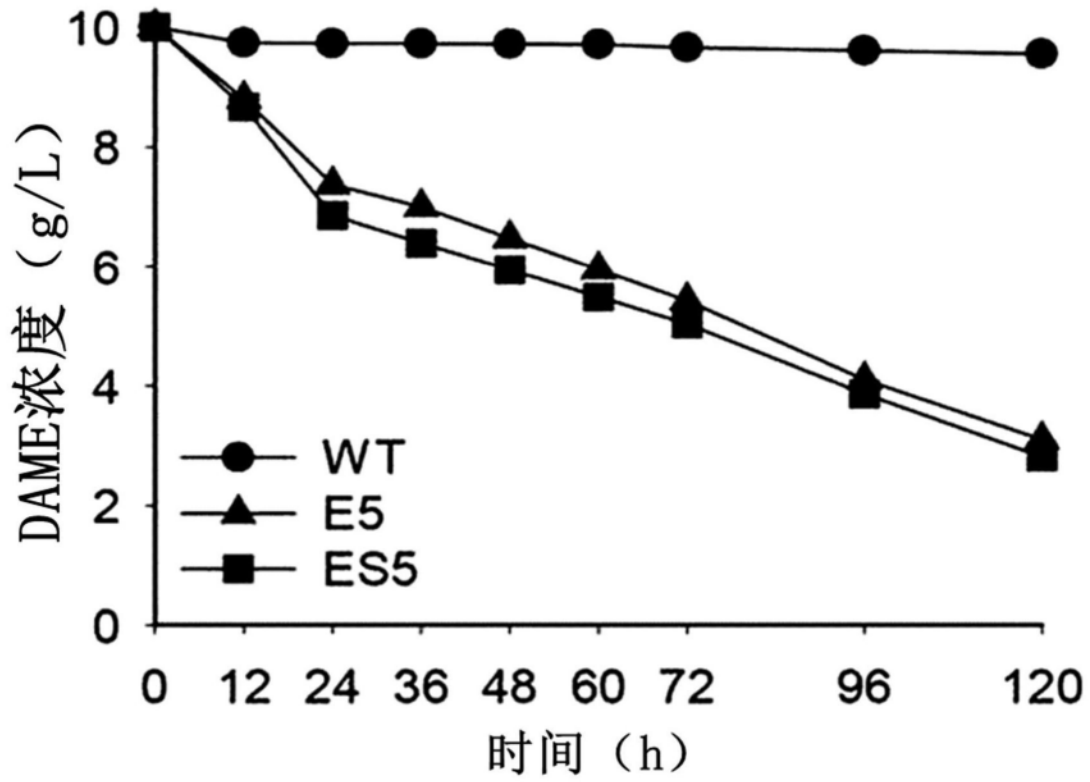


图4

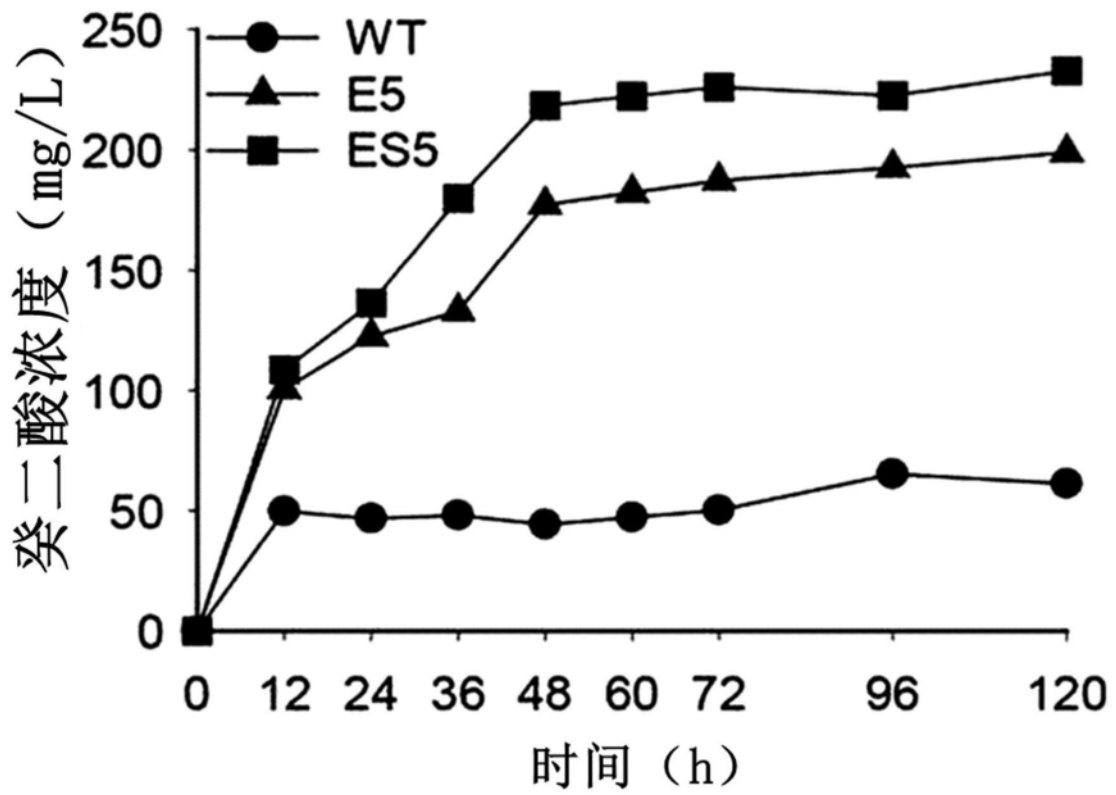


图5

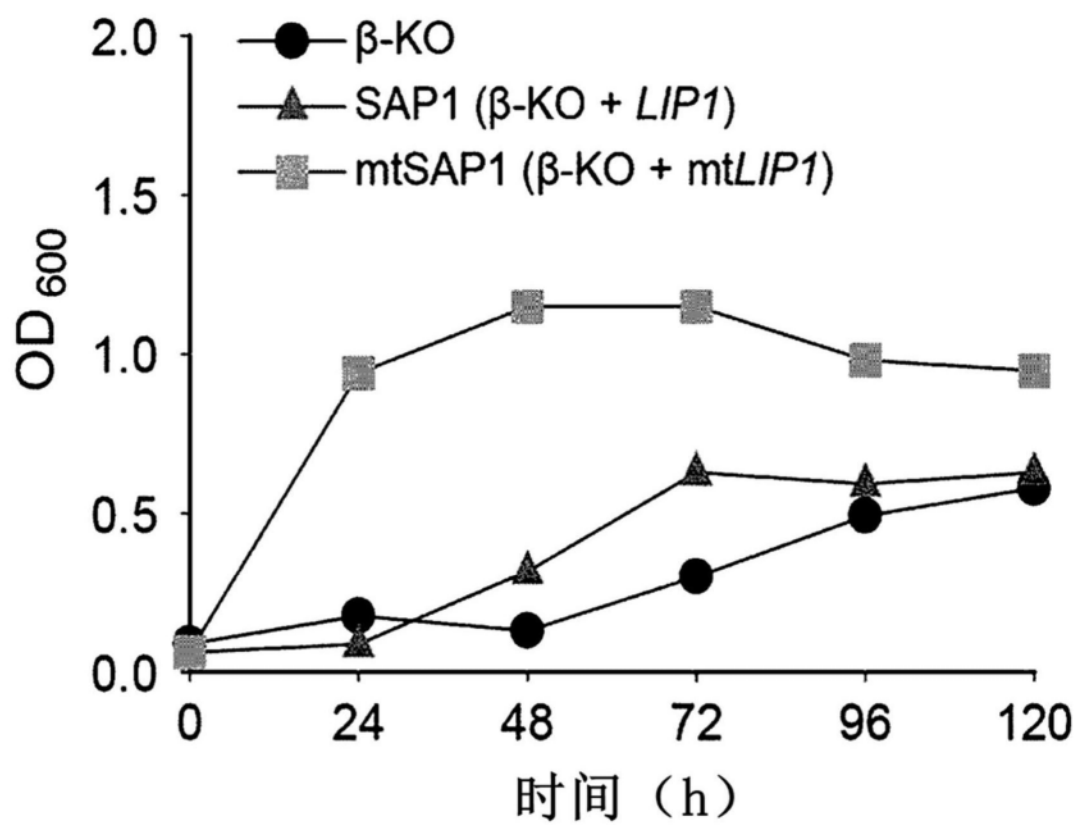


图6

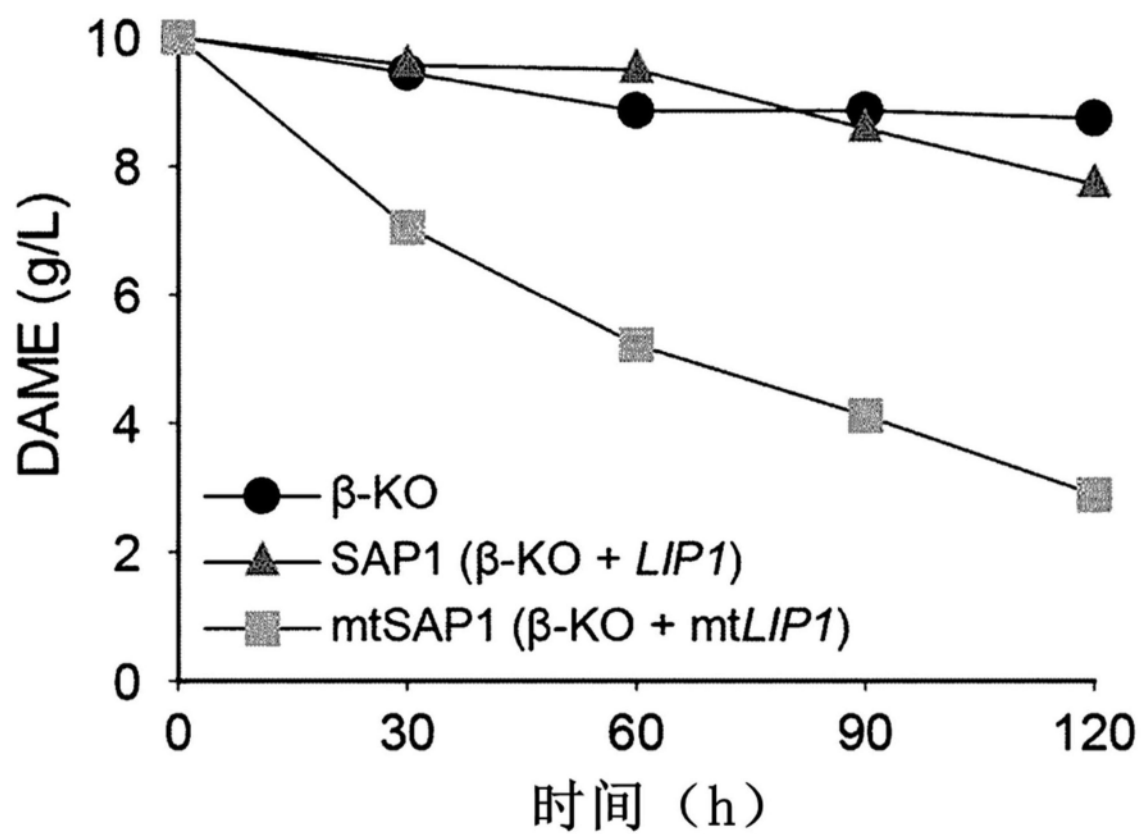


图7

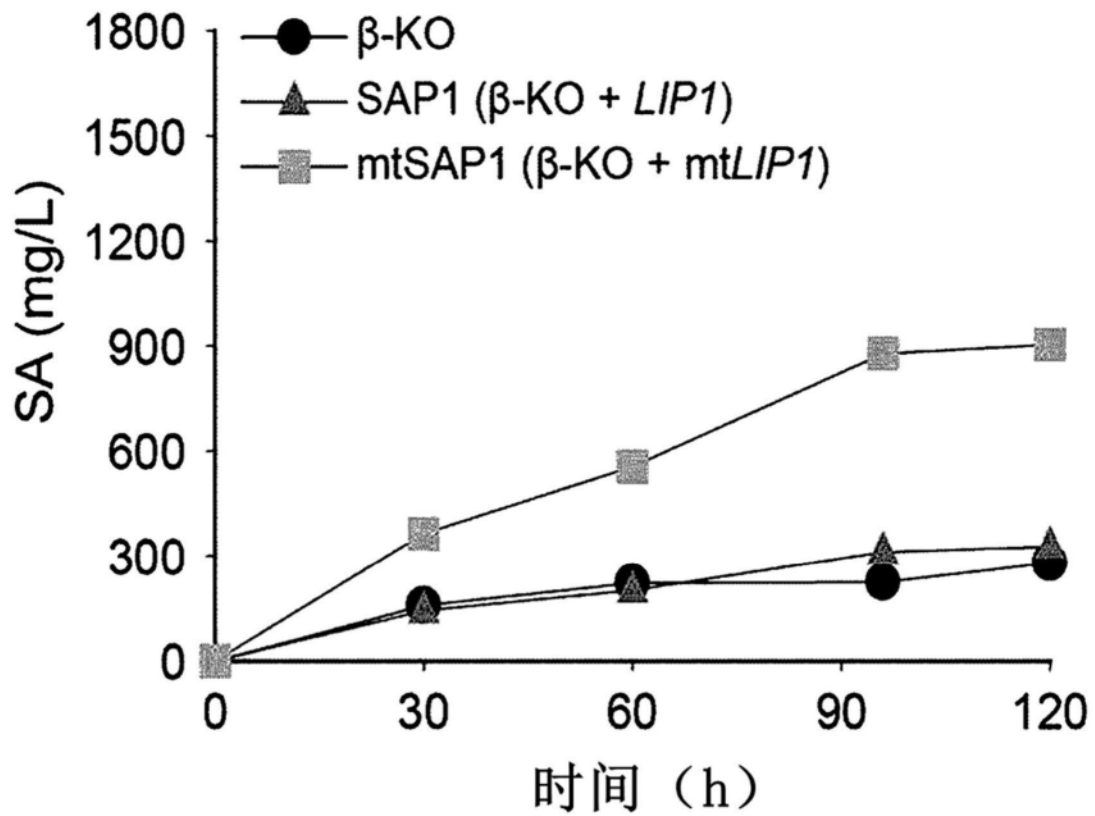


图8

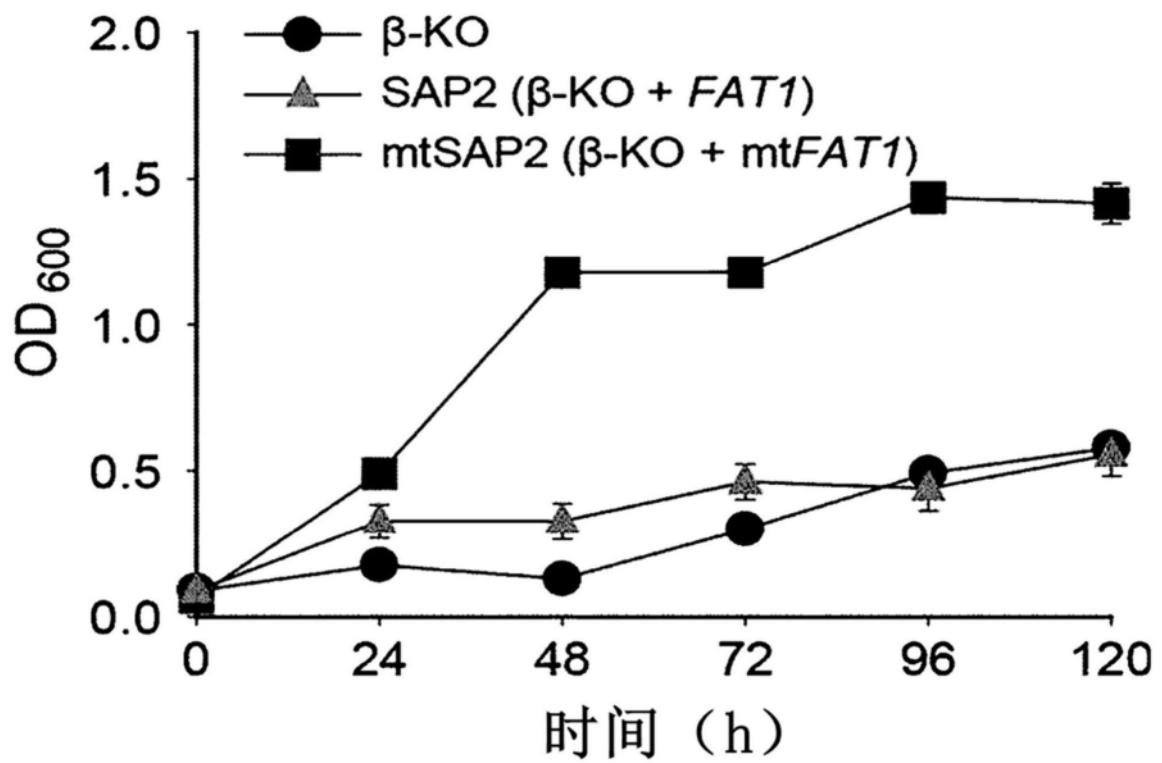


图9

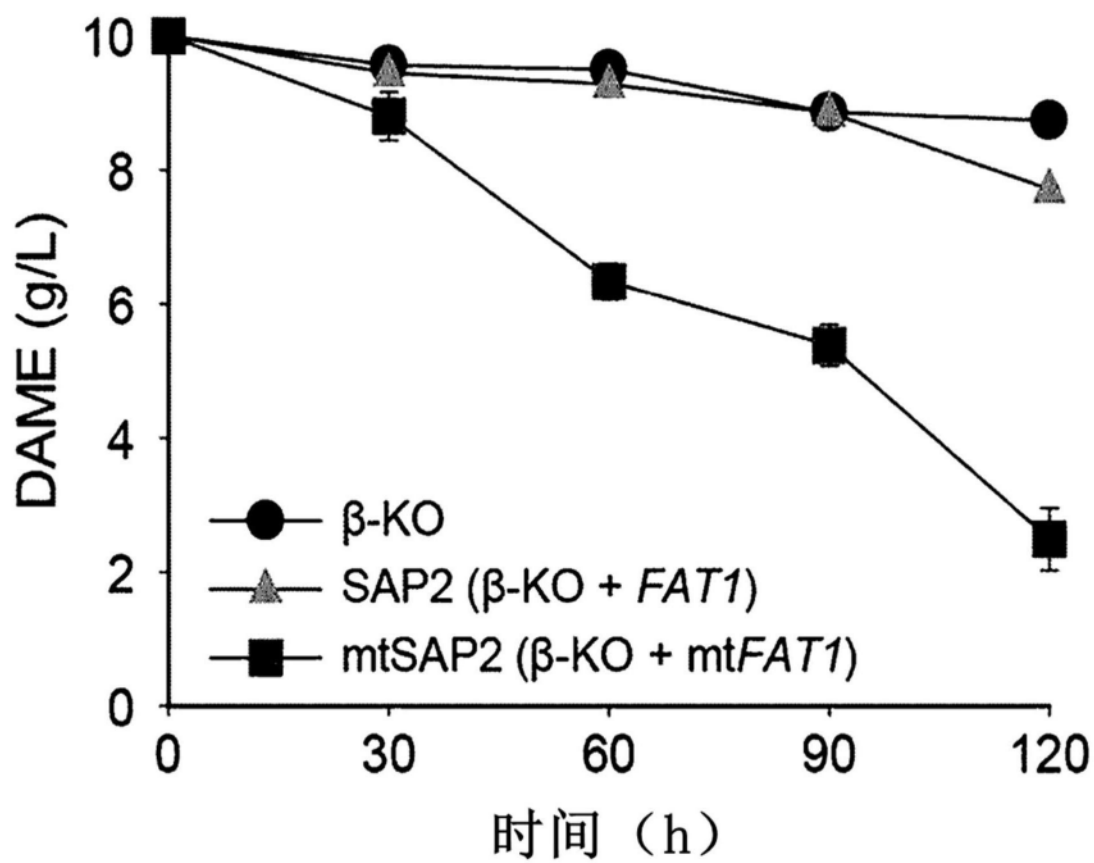


图10

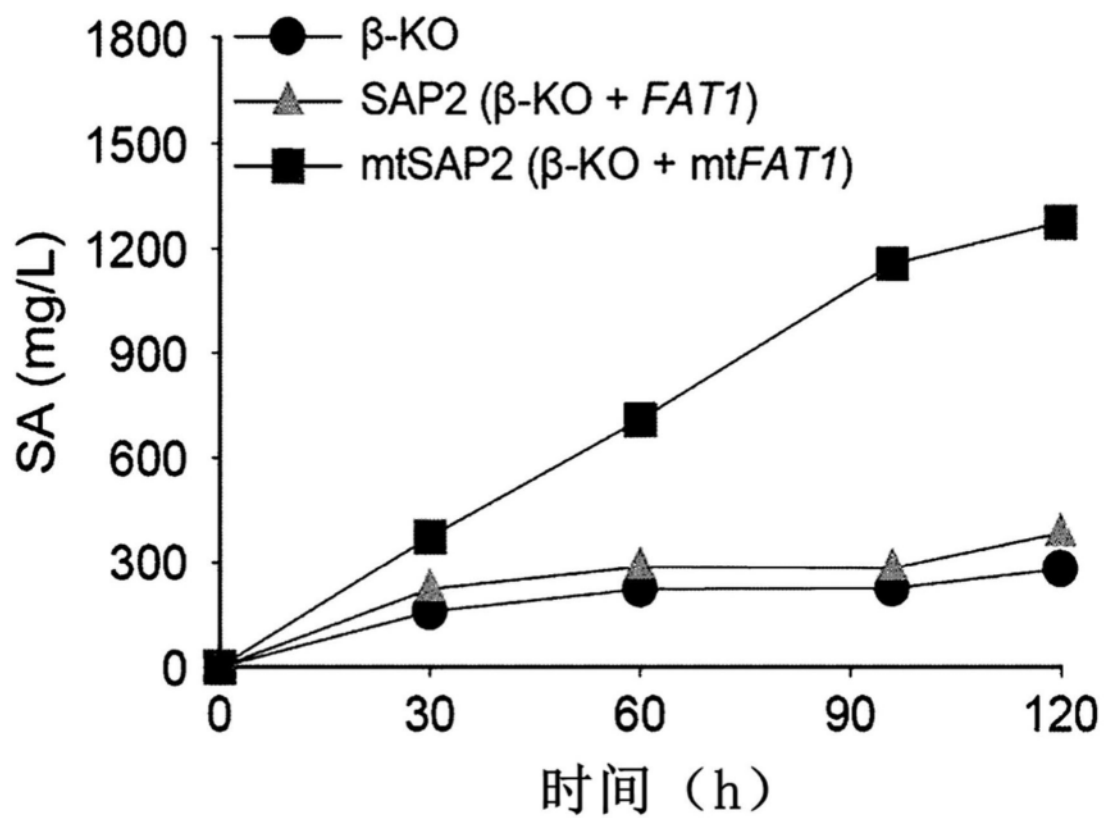


图11

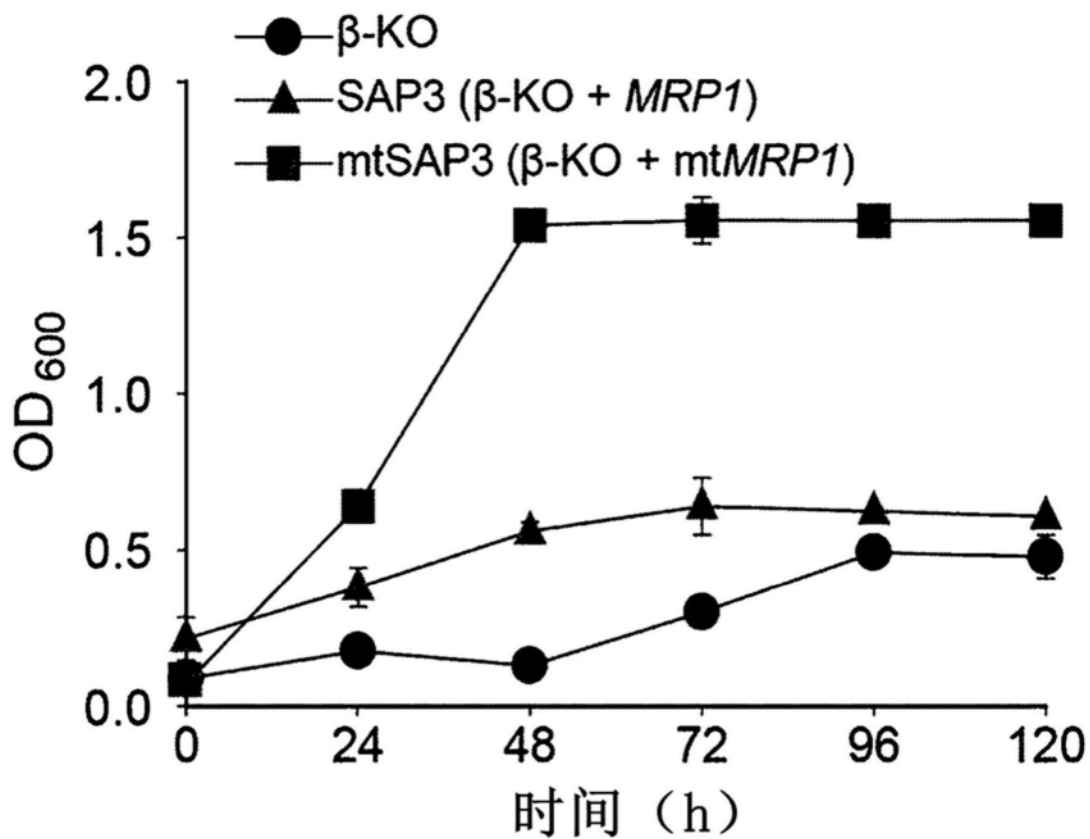


图12

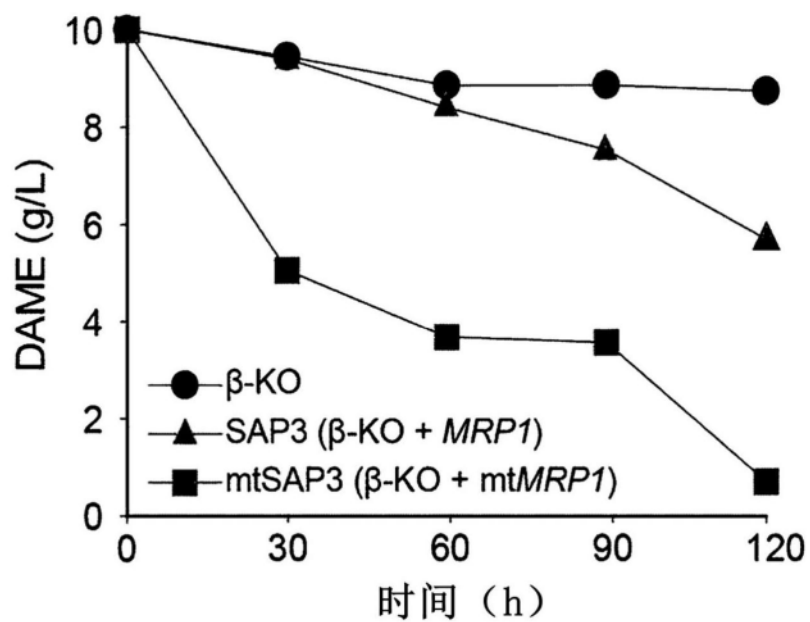


图13

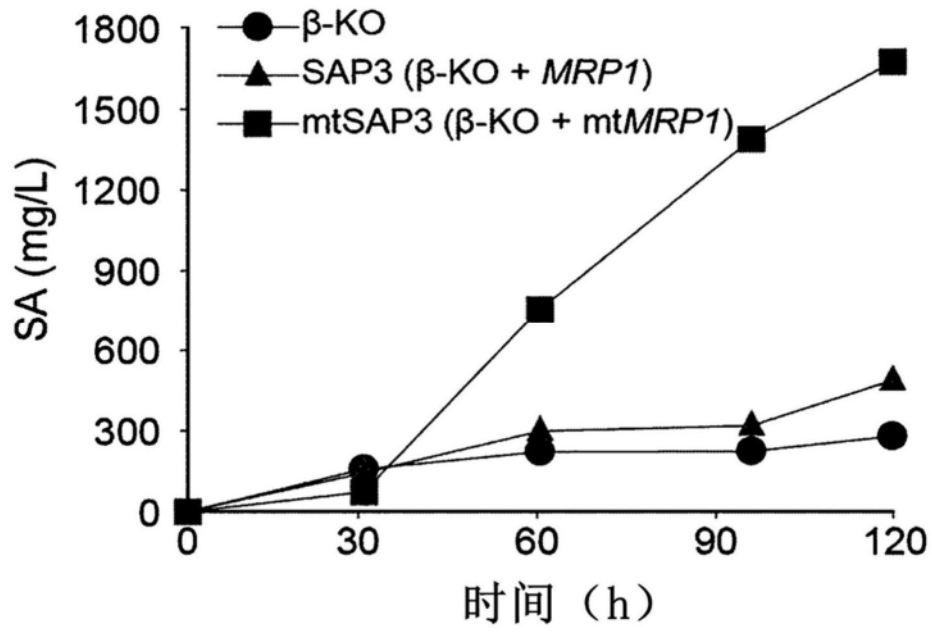


图14

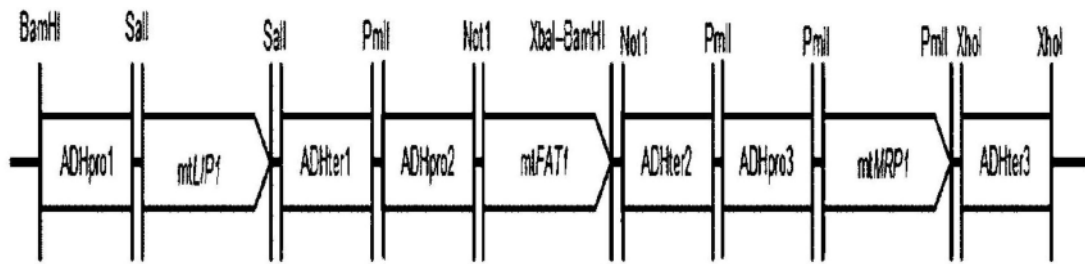


图15

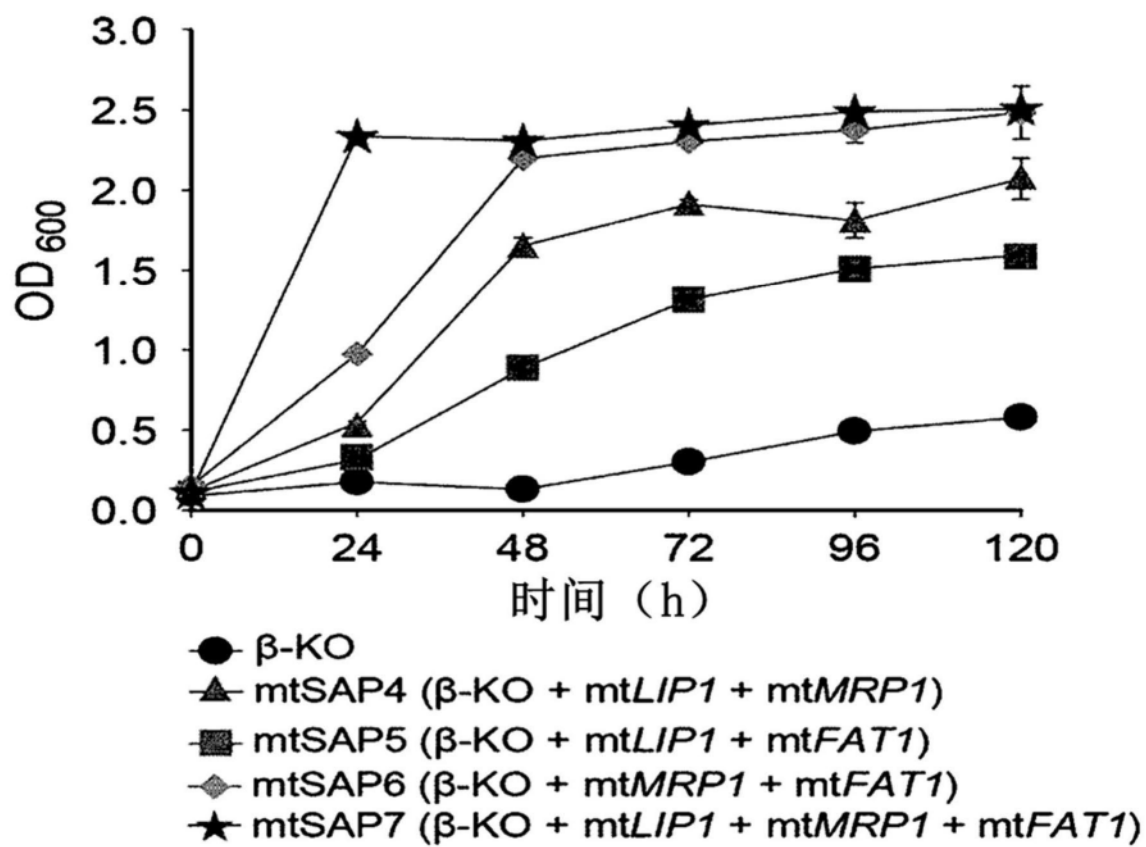


图16

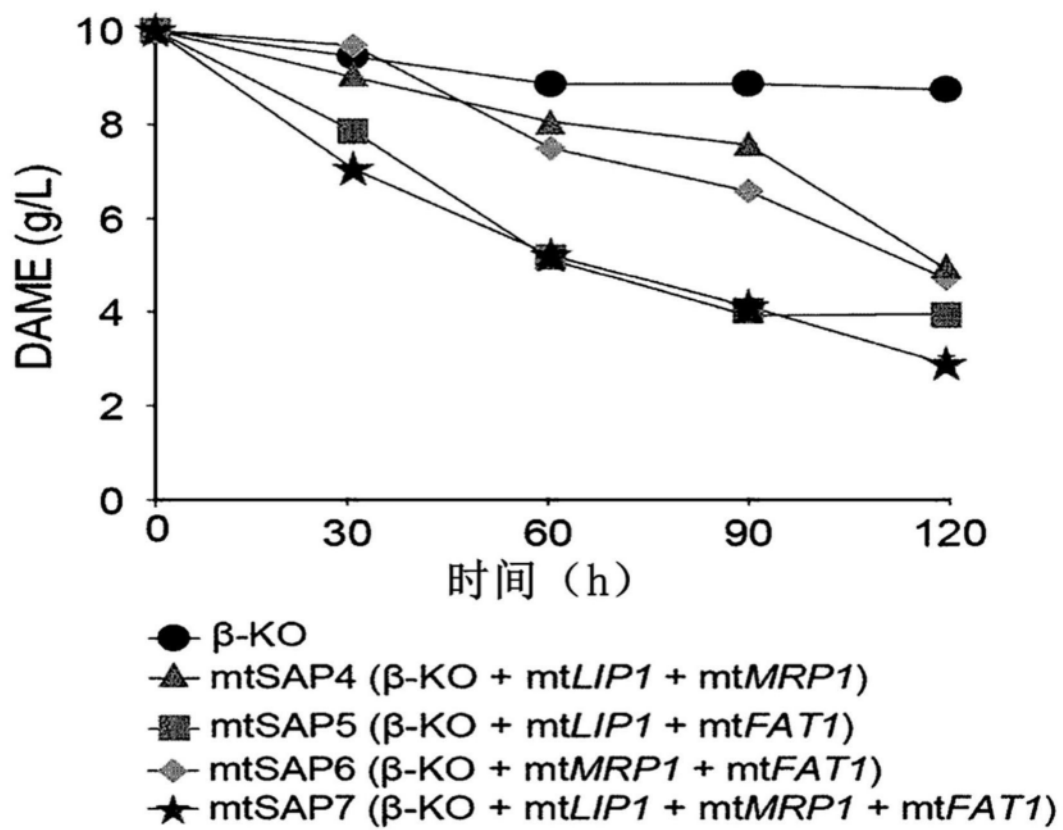


图17

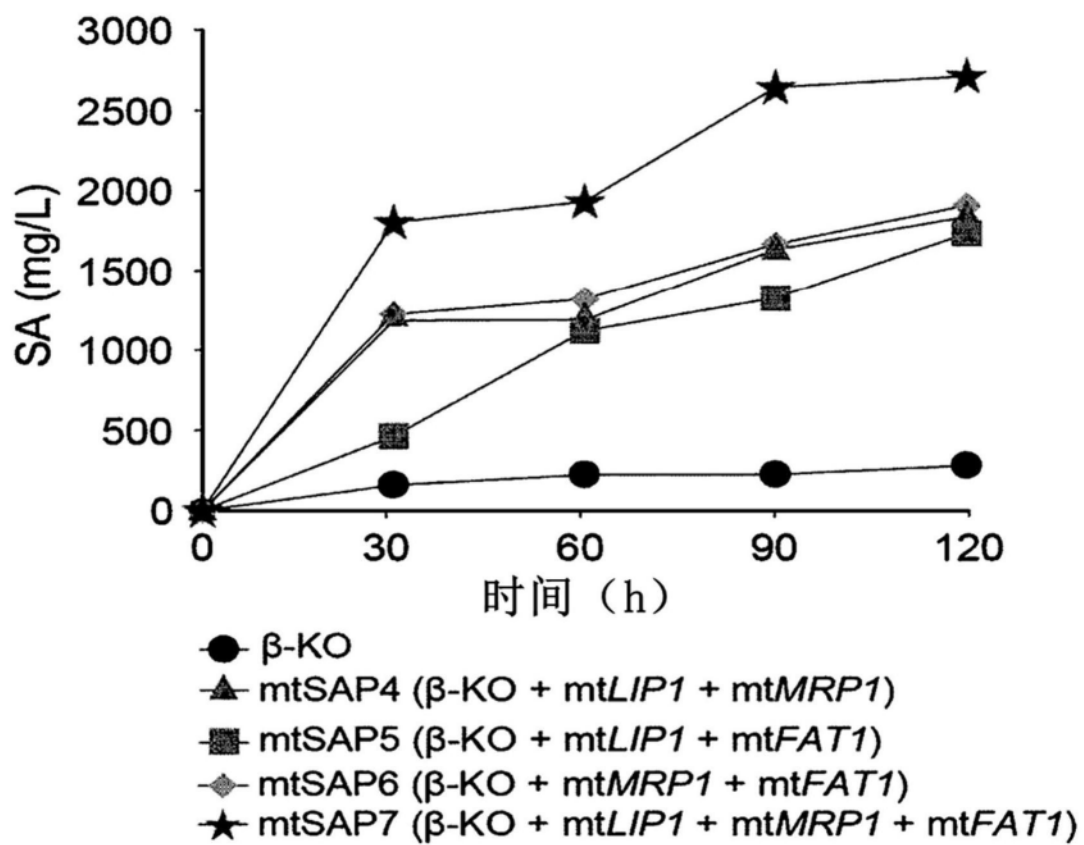


图18

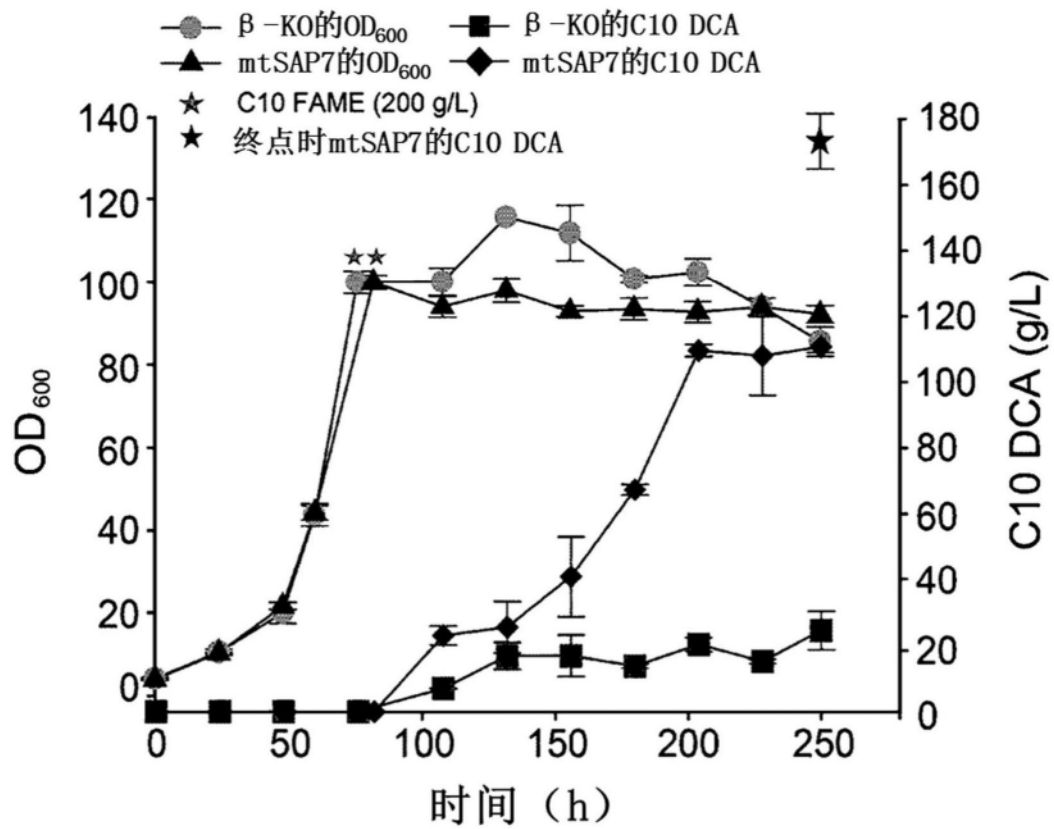


图19

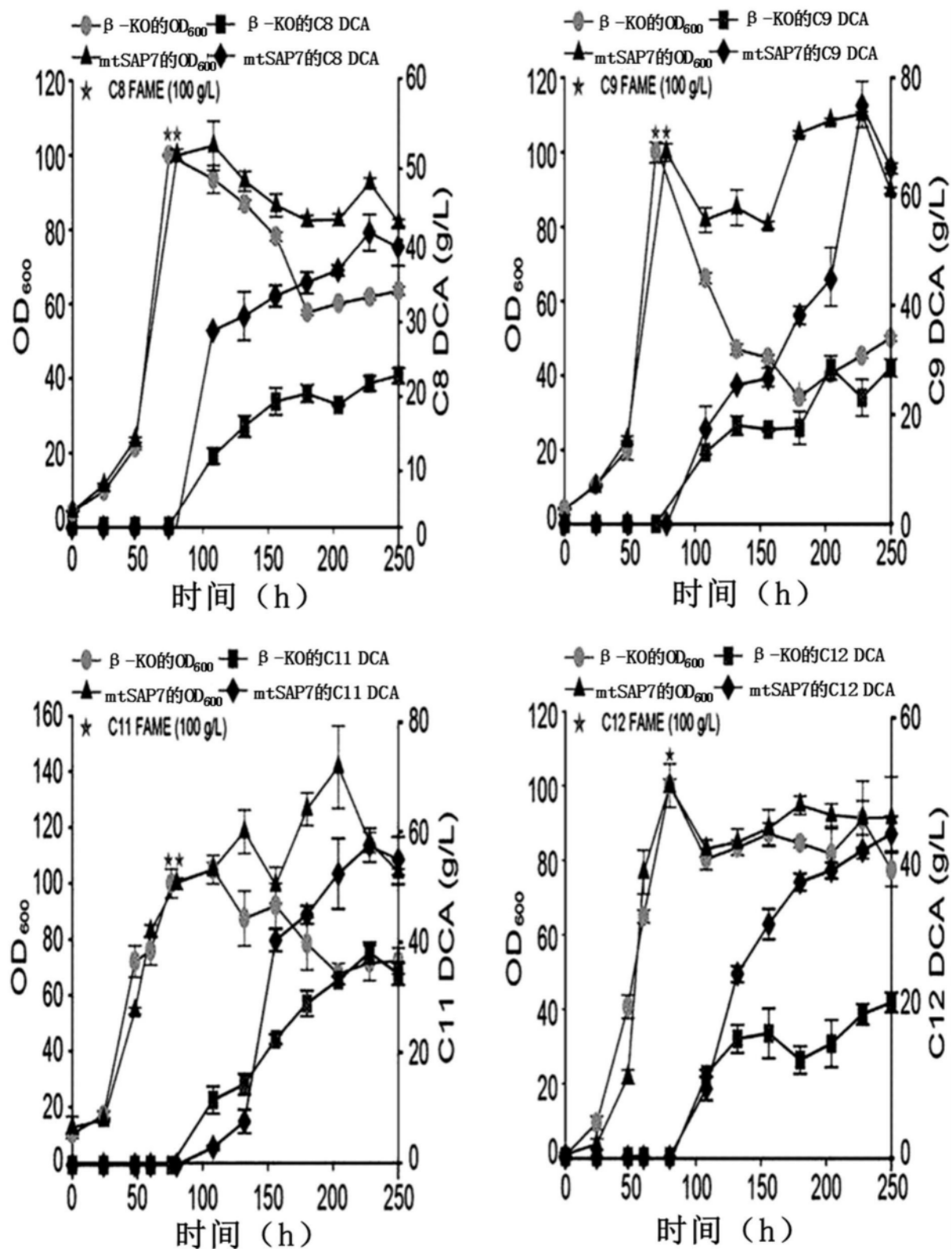


图20