



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102666867 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201080052282. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 11. 23

C12P 7/16 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07C 29/86 (2006. 01)

61/263, 522 2009. 11. 23 US

C12N 1/28 (2006. 01)

C07C 33/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/057846 2010. 11. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02011/063402 EN 2011. 05. 26

(71) 申请人 布特马斯先进生物燃料有限责任公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 R·帕特奈克 M·C·格拉迪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李慧惠 李炳爱

权利要求书 3 页 说明书 36 页

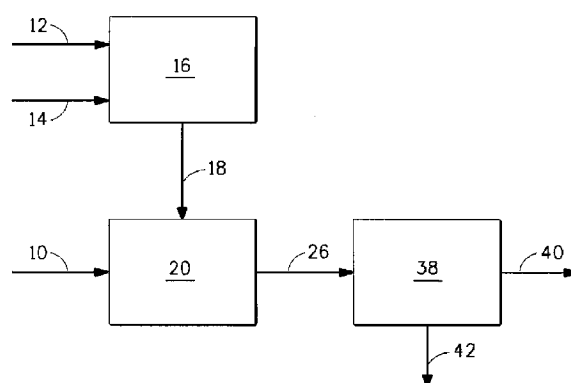
序列表 100 页 附图 4 页

(54) 发明名称

使用添加渗透物的萃取发酵生产丁醇的方法

(57) 摘要

本文提供了通过微生物发酵生产丁醇的方法,其中在发酵期间在至少一种渗透物的存在下通过把丁醇产物萃取到与水不混溶的有机萃取剂中将其移除,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。所述渗透物可包括单糖、二糖、甘油、甘蔗汁、糖蜜、聚乙二醇、葡聚糖、高果糖玉米糖浆、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。本文还提供了从发酵培养基中回收丁醇的方法和组合物。



1. 从发酵培养基中回收丁醇的方法,所述方法包括:
 - a) 提供包含丁醇、水、至少一种渗透物和从至少一种可发酵碳源中生产丁醇的经基因修饰的微生物的发酵培养基,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数;
 - b) 使所述发酵培养基与以下物质接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物:i) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物,和任选地 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 脂肪醇、 C_7 - C_{22} 脂肪酸、 C_7 - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_7 - C_{22} 脂肪醛、 C_7 - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物;以及
 - c) 任选地从所述含丁醇有机相中回收所述丁醇以生产回收的丁醇。
2. 权利要求 1 的方法,其中一部分所述丁醇通过包括以下步骤的方法同时从所述发酵培养基中被移除:
 - a) 用气体从所述发酵培养基中汽提丁醇以形成含丁醇气相;以及
 - b) 从所述含丁醇气相中回收丁醇。
3. 权利要求 1 的方法,其中将所述渗透物加入到所述发酵培养基、所述第一萃取剂、所述任选的第二萃取剂、或它们的组合中。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述渗透物包括单糖、二糖、甘油、甘蔗汁、糖蜜、聚乙二醇、葡聚糖、高果糖玉米糖浆、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述渗透物包括单糖,所述单糖选自蔗糖、果糖、葡萄糖、以及它们的组合。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述渗透物选自聚乙二醇、葡聚糖、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述经基因修饰的微生物选自细菌、蓝细菌、丝状真菌和酵母。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述细菌选自发酵单胞菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、红球菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、乳杆菌属、肠球菌属、片球菌属、产碱菌属、克雷伯氏菌属、类芽孢杆菌属、节杆菌属、棒状杆菌属和短杆菌属。
9. 权利要求 7 的方法,其中所述酵母选自毕赤酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、伊萨酵母属和糖酵母属。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述第一萃取剂选自油醇、二十二醇、鲸蜡醇、月桂醇、肉豆蔻醇、硬脂醇、油酸、月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、肉豆蔻酸甲酯、油酸甲酯、月桂醛、1-十二烷醇、以及这些的组合。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述第一萃取剂包括油醇。
12. 权利要求 1 的方法,其中所述第二萃取剂选自 1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、2-十一烷醇、1-壬醛、以及这些的组合。
13. 权利要求 1 的方法,其中所述丁醇为 1-丁醇。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述丁醇为 2-丁醇。
15. 权利要求 1 的方法,其中所述丁醇为异丁醇。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述发酵培养基还包含乙醇,并且所述含丁醇有机相包含

乙醇。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述经基因修饰的微生物包含灭活碳流竞争性途径的修饰。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述经基因修饰的微生物不生产丙酮。

19. 生产丁醇的方法,包括:

a) 提供从至少一种可发酵碳源中生产丁醇的经基因修饰的微生物;

b) 使所述微生物在双相发酵培养基中生长,所述双相发酵培养基包含水相和 i) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物,和任选地 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 醇、 C_7 - C_{22} 羧酸、 C_7 - C_{22} 羧酸的酯、 C_7 - C_{22} 醛、 C_7 - C_{22} 酰胺以及它们的混合物,其中所述双相发酵培养基还包含至少一种渗透物,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数,培养时间足以使所述丁醇被萃取至所述有机萃取剂以形成含丁醇有机相;

c) 将所述含丁醇有机相与所述水相分离;以及

d) 任选地从所述含丁醇有机相中回收所述丁醇以生产回收的丁醇。

20. 权利要求 19 的方法,其中将所述渗透物在所述微生物生长期内加入到所述水相中、在所述丁醇生产期内加入到所述水相中、当所述水相中的丁醇浓度抑制时加入到所述水相中、加入到所述第一萃取剂中、加入到所述任选的第二萃取剂中、或加入到它们的组合中。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述渗透物得自发酵碳水化合物底物。

22. 生产丁醇的方法,包括:

a) 提供从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇的经基因修饰的微生物;

b) 使所述微生物在发酵培养基中生长,其中所述微生物将丁醇生产到所述发酵培养基中以生产含丁醇的发酵培养基;

c) 将至少一种渗透物加入到所述发酵培养基中以提供至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数的渗透物浓度;

d) 使至少一部分所述含丁醇的发酵培养基与以下物质接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物:i) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物,和任选地 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 醇、 C_7 - C_{22} 羧酸、 C_7 - C_{22} 羧酸的酯、 C_7 - C_{22} 醛、 C_7 - C_{22} 酰胺以及它们的混合物;

e) 将所述含丁醇有机相与所述水相分离;

f) 任选地从所述含丁醇有机相中回收所述丁醇;以及

g) 任选地使至少一部分所述水相返回至所述发酵培养基。

23. 权利要求 22 的方法,其中当所述微生物生长期减缓时,将所述渗透物加入到步骤(c)的发酵培养基中。

24. 权利要求 22 的方法,其中当所述丁醇生产期结束时,将所述渗透物加入到步骤 (c) 的发酵培养基中。

25. 权利要求 1、19 或 22 中的任一项的方法,其中所述至少一种可发酵碳源存在于所述发酵培养基中且包括可再生的碳,所述碳来自农业原料、藻类、纤维素、半纤维素、木质纤维素、或它们的任何组合。

26. 组合物,包含

(a) 包含丁醇、水、至少一种渗透物和从至少一种可发酵碳源中生产丁醇的经基因修饰的微生物的发酵培养基,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数;

b) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物;和

c) 任选地第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 脂肪醇、 C_7 - C_{22} 脂肪酸、 C_7 - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_7 - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物;

其中可形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物,并且从而可从 (a) 的发酵培养基中分离丁醇。

使用添加渗透物的萃取发酵生产丁醇的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求提交于 2009 年 11 月 23 日的美国临时专利申请序列号 61/263, 522 的优先权, 该申请全文以引用方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及生物燃料领域。更具体地讲, 本发明涉及通过微生物发酵生产丁醇的方法, 其中在发酵培养基中存在至少一种渗透物, 其浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数, 并且通过把丁醇产物萃取到与水不混溶的有机萃取剂中将其移除。

[0004] 发明背景

[0005] 丁醇是重要的具有多种用途的工业化学品, 例如用作燃料添加剂, 用作柴油燃料的共混组分, 在塑料工业中用作化学原料, 以及在食品和香料工业中用作食品级萃取剂。每年, 通过石化方法生产出 100 至 120 亿磅丁醇。随着对丁醇的需求增加, 对通过发酵由可再生资源如玉米、甘蔗或纤维素进料生产这种化学制品的关注不断增加。

[0006] 在制备丁醇的发酵过程中, 就地产物移除有利地降低了丁醇对微生物的抑制, 并且通过控制发酵液中的丁醇浓度来改善发酵速率。就地产物移除技术包括反萃取、吸附、全蒸发、膜溶剂萃取和液-液萃取。在液-液萃取中, 使萃取剂与发酵液接触以使丁醇在发酵液与萃取相之间分配。由分离过程例如通过蒸馏回收丁醇和萃取剂。

[0007] 公布的专利申请 US 2009/0171129A1 公开了从稀释水溶液如发酵液中回收 C3-C6 醇的方法。该方法包括将水溶液部分中的 C3-C6 醇活性提高到该部分中至少饱和的 C3-C6 醇活性。如本发明实施方案所述, C3-C6 醇活性的提高可包括将亲水性溶质加入到水溶液中。添加足量的亲水性溶质以形成第二液相, 该过程或者通过单独加入亲水性溶质或者与其他方法步骤组合进行。加入的亲水性溶质可为盐、氨基酸、水溶性溶剂、糖或那些溶质的组合。

[0008] 提交于 2009 年 6 月 4 日的美国专利公开申请 12/478, 389 公开了从发酵液中生产并回收丁醇的方法, 所述方法包括使发酵液与水不混溶的有机萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物的步骤, 所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、以及它们的混合物。

[0009] 美国临时专利申请 61/168, 640 ; 61/168, 642 ; 和 61/168, 645 ; 同时提交于 2009 年 4 月 13 日 ; 以及 61/231, 697 ; 61/231, 698 ; 和 61/231, 699 ; 同时提交于 2009 年 8 月 6 日, 公开了从发酵液中生产并回收丁醇的方法, 所述方法包括使发酵液与水不混溶的有机萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物的步骤, 所述萃取剂包括第一溶剂和第二溶剂, 所述第一溶剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、以及它们的混合物, 并且所述第二溶剂选自 C_7 - C_{11} 醇、 C_7 - C_{11} 羧酸、 C_7 - C_{11} 羧酸的酯、 C_7 - C_{11} 醛、以及它们的混合物。

[0010] 用于从发酵培养基生产和回收丁醇的改进的方法在不断地被寻求。期望其中将渗

透物加入到发酵培养基中的丁醇就地产物移除方法,该方法提供了改善的丁醇萃取效率和可接受的微生物生物相容性。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了从发酵培养基中回收丁醇的方法,所述发酵培养基包含丁醇、水、至少一种渗透物和经基因修饰的微生物,该微生物从至少一种可发酵碳源中生产丁醇。存在于发酵培养基中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。本发明也提供了使用此类微生物不能够加入渗透物生产丁醇的方法。所述方法包括使发酵培养基与以下物质接触:i) 第一与水不混溶的有机萃取剂和任选的 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,任选地从所述有机相中分离含丁醇有机相,并且从含丁醇有机相中回收所述丁醇。在本发明的一个实施方案中,提供了从发酵培养基中回收丁醇的方法,所述方法包括:

[0013] a) 提供包含丁醇、水、至少一种渗透物和从至少一种可发酵碳源中生产丁醇的经基因修饰的微生物的发酵培养基,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数;

[0014] b) 使所述发酵培养基与以下物质接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物:i) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物,和任选地 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 脂肪醇、 C_7 - C_{22} 脂肪酸、 C_7 - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_7 - C_{22} 脂肪醛、 C_7 - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物;

[0015] c) 任选地将所述含丁醇有机相与所述水相分离;以及

[0016] d) 任选地从所述含丁醇有机相中回收丁醇以生产回收的丁醇。

[0017] 在一些实施方案中,一部分丁醇通过包括以下步骤的方法同时从发酵培养基中被移除:a) 用气体从所述发酵培养基中汽提丁醇以形成含丁醇气相;以及 b) 从所述含丁醇气相中回收丁醇。

[0018] 如本发明方法所述,可将渗透物加入发酵培养基、第一萃取剂、任选的第二萃取剂、或它们的组合。在一些实施方案中,所述渗透物包括单糖、二糖、甘油、甘蔗汁、糖蜜、聚乙二醇、葡聚糖、高果糖玉米糖浆、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。在一些实施方案中,所述渗透物包括单糖,所述单糖选自蔗糖、果糖、葡萄糖、以及它们的组合。在一些实施方案中,所述渗透物选自聚乙二醇、葡聚糖、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。

[0019] 如本发明方法所述,在一些实施方案中所述经基因修饰的微生物选自细菌、蓝细菌、丝状真菌和酵母。在一些实施方案中,所述细菌选自发酵单胞菌属、埃希氏菌属、沙门氏菌属、红球菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、乳杆菌属、肠球菌属、片球菌属、产碱菌属、克雷伯氏菌属、类芽孢杆菌属、节杆菌属、棒状杆菌属和短杆菌属。在一些实施方案中所述酵母选自毕赤酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、克鲁维酵母属、伊萨酵母属和糖酵母属。

[0020] 如本发明方法所述,所述第一萃取剂可选自油醇、二十二醇、鲸蜡醇、月桂醇、肉豆蔻醇、硬脂醇、油酸、月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、肉豆蔻酸甲酯、油酸甲酯、月桂醛、1-十二烷醇、以及这些的组合。在一些实施方案中,所述第一萃取剂包括油醇。在一些实施方案中,所述第二萃取剂可选自 1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、2-十一烷醇、1-壬醛、以及这些的组合。

[0021] 在一些实施方案中,所述丁醇为 1-丁醇。在一些实施方案中,所述丁醇为 2-丁醇。在一些实施方案中,所述丁醇为异丁醇。在一些实施方案中,所述发酵培养基还包含乙醇,并且所述含丁醇有机相包含乙醇。

[0022] 在本发明的一个实施方案中,提供了生产丁醇的方法,所述方法包括:

[0023] a) 提供从至少一种可发酵碳源中生产丁醇的经基因修饰的微生物;

[0024] b) 使所述微生物在双相发酵培养基中生长,所述双相发酵培养基包含水相和 i) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物,和任选地 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 醇、 C_7 - C_{22} 羧酸、 C_7 - C_{22} 羧酸的酯、 C_7 - C_{22} 醛、 C_7 - C_{22} 酰胺、以及它们的混合物,其中所述双相发酵培养基还包含至少一种渗透物,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数,培养时间足以使所述丁醇被萃取至所述有机萃取剂以形成含丁醇有机相;

[0025] c) 将所述含丁醇有机相与所述水相分离;以及

[0026] d) 任选地从所述含丁醇有机相中回收所述丁醇以生产回收的丁醇。

[0027] 在本发明的一个实施方案中,提供了生产丁醇的方法,所述方法包括:

[0028] a) 提供从至少一种可发酵碳源中生产丁醇的经基因修饰的微生物;

[0029] b) 使所述微生物在发酵培养基中生长,其中所述微生物将丁醇生产到所述发酵培养基中以生产含丁醇的发酵培养基;

[0030] c) 将至少一种渗透物加入到所述发酵培养基中以提供至少足以提高相对于在所述基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数的渗透物浓度;

[0031] d) 使至少一部分所述含丁醇的发酵培养基与以下物质接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物:i) 第一与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物,和任选的 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 醇、 C_7 - C_{22} 羧酸、 C_7 - C_{22} 羧酸的酯、 C_7 - C_{22} 醛、 C_7 - C_{22} 酰胺以及它们的混合物;

[0032] e) 将所述含丁醇有机相与所述水相分离;

[0033] f) 任选地从所述含丁醇有机相中回收所述丁醇;以及

[0034] g) 任选地使至少一部分所述水相返回至所述发酵培养基。

[0035] 在一些实施方案中,当所述微生物生长期减缓时,可将所述渗透物加入到步骤 (c) 的发酵培养基中。在一些实施方案中,当所述丁醇生产期结束时,可将所述渗透物加入到步骤 (c) 的发酵培养基中。

[0036] 在一些实施方案中,所述经基因修饰的微生物包含灭活碳流竞争性途径的修饰。在一些实施方案中,所述经基因修饰的微生物不产生丙酮。

[0037] 附图简述和序列描述

[0038] 图 1 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中在使发酵培养基与萃取剂在发酵容器中接触之前,所述第一萃取剂和所述第二萃取剂在容器中被合并。

[0039] 图 2 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中所述第一萃取剂和所述第二

萃取剂被分别加入至发酵容器,发酵培养基在该容器中与萃取剂接触。

[0040] 图 3 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中所述第一萃取剂和所述第二萃取剂被分别加入不同的发酵容器中。

[0041] 图 4 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中对产物的萃取在发酵罐的下游进行,并且在使发酵培养基与萃取剂在容器中接触之前,所述第一萃取剂和所述萃取剂在不同的容器中被合并。

[0042] 图 5 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中对产物的萃取在发酵罐的下游进行,并且第一萃取剂和第二萃取剂被分别加入容器中,其中发酵培养基与所述萃取剂接触。

[0043] 图 6 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中对产物的萃取在发酵罐的下游进行,并且第一萃取剂和第二萃取剂被分别加入不同容器中以与发酵培养基接触。

[0044] 图 7 是对本发明的方法的一个实施方案的图解,其中对产物的萃取在至少一个分批发酵罐中进行,通过与发酵醪液底部或接近底部处的(使发酵罐充满萃取剂)与水不混溶的有机萃取剂共流,其中所述萃取剂在该发酵罐的顶部或接近顶部处的一点流出该发酵罐。

[0045] 下列序列符合 37C. F. R. 1. 821 1. 825 (“对含有核酸序列和 / 或氨基酸序列公开的专利申请的要求—序列规则”),并且与世界知识产权组织 (WIPO) 标准 ST. 25 (2009) 和 EPO 和 PCT 的序列列表要求 (规则 5. 2 和 49. 5(a bis), 以及行政指导的 208 节和附录 C) 相一致。

[0046] 表 1a: 编码序列和蛋白质的序列号 (SEQ ID Number)

[0047]

说明	SEQ ID NO: 核酸	SEQ ID NO: 氨基酸
肺炎克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) <i>budB</i> (乙酰乳酸合酶)	1	2
大肠杆菌 <i>ilvC</i> (乙酰羟酸还原异构酶)	3	4
大肠杆菌 <i>ilvD</i> (乙酰羟酸脱水酶)	5	6
乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>) <i>kivD</i> (支链 α -酮酸脱羧酶)	7 (密码子优化的)	8
木糖氧化无色杆菌 (<i>Achromobacter xylosoxidans</i>) <i>sadB</i> (丁醇脱氢酶)	9	10
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) <i>alsS</i> (乙酰乳酸合酶)	11	12
啤酒糖酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) <i>ILV5</i> (乙酰羟酸还原异构酶; “KARI”)	13	14
突变体 KARI (由 Pf5. <i>ilvC</i> -Z4B8 编码)	15	16
变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>) <i>ilvD</i> (乙酰羟酸脱水酶)	17	18

[0048]

枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) <i>kivD</i> (支链酮酸脱羧酶)	19 (密码子优化的)	20
马肝醇脱氢酶 (HADH)	56 (密码子优化的)	57
大肠杆菌 <i>pflB</i> (丙酮酸甲酸裂解酶)	71	70
大肠杆菌 <i>frdB</i> (延胡索酸还原酶络合物亚基)	73	72
大肠杆菌 <i>ldhA</i> (乳酸脱氢酶)	77	76
大肠杆菌 <i>adhE</i> (醇脱氢酶)	75	74
大肠杆菌 <i>frdA</i> (延胡索酸还原酶络合物亚基)	91	90
大肠杆菌 <i>frdC</i> (延胡索酸还原酶络合物亚基)	93	92
大肠杆菌 <i>frdD</i> (延胡索酸还原酶络合物亚基)	95	94

[0049] 表 1b :构建体、引物和载体中使用的序列的序列号 (SEQ ID Number)

[0050]

说明	SEQ ID NO :
pRS425::GPM-sadB	63
GPM-sadB-ADHt 片段	21
pUC19-URA3r	22
114117-11A	23
114117-11B	24
114117-11C	25
114117-11D	26
114117-13A	27
114117-13B	28
112590-34F	29
112590-34G	30
112590-34H	31
112590-49E	32
i1vD-FBA1t 片段	33
114117-27A	34

114117-27B	35
114117-27C	36
114117-27D	37
114117-36D	38
135	39
112590-30F	40
URA3r2 模板	41
114117-45A	42
114117-45B	43
PDC5::KanMXF	44
PDC5::KanMXR	45
PDC5kofor	46
N175	47
pLH475-Z4B8 质粒	48
CUP1 启动子	49
CYC1 终止子 CYC1-2	50
ILV5 启动子	51
ILV5 终止子	52
FBA1 启动子	53
CYC1 终止子	54
pLH468 质粒	55
载体 pNY8	58
GPD1 启动子	59
GPD1 启动子片段	60

OT1068	61
OT1067	62
GPM1 启动子	64
ADH1 终止子	65
OT1074	66
OT1075	67
pRS423FBA ilvD(Strep)	68
FBA 终止子	69
pflB CkUp	78
pflB CkDn	79
frdB CkUp	80
frdB CkDn	81
ldhA CkUp	82
ldhA CkDn	83
adhE CkUp	84
adhE CkDn	85
N473	86
N469	87
N695A	88
N695B	89

[0051] 发明详述

[0052] 本发明提供了从包含至少一种渗透物的微生物发酵培养基中回收丁醇的方法,该方法通过把丁醇萃取到与水不混溶的有机萃取剂中以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。存在于发酵培养基中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。将所述含丁醇有机相与所述水相分离并且丁醇可被回收。还提供了生产丁醇的方法。

[0053] 定义

[0054] 在本公开中使用了下列定义。

[0055] 术语“渗透物”指影响渗透的有机化合物。渗透物可溶于细胞内溶液和 / 或环境流体（例如发酵液）中，并且起到保持细胞体积、液体平衡和水势的作用。

[0056] 术语“丁醇”指 1- 丁醇、2- 丁醇和 / 或异丁醇单体或它们的混合物。

[0057] 术语“与水不混溶的”是指化学组分如萃取剂或溶剂不能够以形成单一液相的形式与水溶液如发酵液混合。

[0058] 如本文所用，术语“萃取剂”是指用于从发酵液中萃取丁醇的一种或多种有机溶剂。

[0059] 术语“双相发酵培养基”是指包含发酵培养基（即水相）和适当量的与水不混溶的有机萃取剂的两相生长培养基。

[0060] 如本文所用，术语“有机相”是指通过使发酵液与水不混溶的有机萃取剂接触而获得的两相混合物中的非水相。

[0061] 如本文所用，术语“水相”是指通过使含水的发酵培养基与水不混溶的有机萃取剂接触获得的两相混合物的包含水的相。

[0062] 如本文所用，术语“就地产物移除”是指从诸如发酵的生物过程中选择性移除具体的发酵产物以控制生物过程中的产物浓度。

[0063] 如本文所用，术语“发酵液”指水、糖、溶解固体、悬浮固体、生产丁醇的微生物、丁醇产物和所有其他保留在发酵容器中的材料组分的混合物，其中丁醇产物通过存在的微生物将糖转化成丁醇、水和二氧化碳（CO₂）的反应来制备。所述发酵液可包含一种或多种可发酵碳源如本文所述的糖。发酵液在双相发酵萃取中是水相。如本文所用，术语“发酵培养基”有时可与“发酵液”同义使用。

[0064] 如本文所用，术语“发酵容器”是指其中进行发酵反应的容器，产物丁醇通过发酵反应由糖制备。本文中术语“发酵罐”可与“发酵容器”同义使用。

[0065] 术语“可发酵碳源”是指能被本文所公开的微生物代谢的碳源。适当的可发酵碳源包括但不限于：单糖，如葡萄糖或果糖；二糖，如乳糖或蔗糖；低聚糖；多糖，如淀粉、纤维素；一碳底物；以及它们的混合物，它们可存在于发酵培养基中。可发酵碳源包括可再生的碳，即非石油基的碳，包括来自农业原料、藻类、纤维素、半纤维素、木质纤维素、或它们的任何组合的碳。

[0066] 本文所用术语“脂肪酸”是指具有 C₇-C₂₂ 碳原子的长脂肪链的羧酸，其中的脂肪链为饱和的或不饱和的。

[0067] 本文所用术语“脂肪醇”是指具有 C₇-C₂₂ 碳原子的长脂肪链的醇，其中的脂肪链为饱和的或不饱和的。

[0068] 本文所用术语“脂肪醛”是指具有 C₇-C₂₂ 碳原子的长脂肪链的醛，其中的脂肪链为饱和的或不饱和的。

[0069] 本文所用术语“脂肪酰胺”是指具有 C₁₂-C₂₂ 碳原子的长脂肪链的酰胺，其中的脂肪链为饱和的或不饱和的。

[0070] 本文中所写为 K_p 的术语“分配系数”，是指化合物在两种不能混溶的溶剂的混合物的两相中平衡时的浓度的比率。分配系数是化合物在两种不能混溶的溶剂中不同的溶解度的量度。如本文所用，术语“丁醇分配系数”是指包含发酵培养基的水相和包含萃取剂的有

机相之间丁醇浓度的比率。如本文所用,分配系数与术语分布系数同义。

[0071] 如本文所用,术语“分离”与“回收”同义,并且是指从初始混合物中移除化合物以获得纯度或浓度比初始混合物中的所述化合物纯度或浓度更高的化合物。

[0072] 本文所用术语“丁醇生物合成途径”是指产生 1- 丁醇、2- 丁醇或异丁醇的酶途径。

[0073] 本文所用术语“1- 丁醇生物合成途径”是指从乙酰 - 辅酶 A (acetyl-CoA) 产生 1- 丁醇的酶途径。

[0074] 本文所用术语“2- 丁醇生物合成途径”是指从丙酮酸产生 2- 丁醇的酶途径。

[0075] 本文所用术语“异丁醇生物合成途径”是指从丙酮酸产生异丁醇的酶途径。

[0076] 本文所用术语“有效滴度”是指每升发酵培养基通过发酵产生的丁醇的总量。丁醇的总量包括:(i) 发酵培养基中丁醇的量;(ii) 从有机萃取剂中回收的丁醇的量;和 (iii) 当采用汽提时从气相中回收的丁醇的量。

[0077] 本文所用术语“有效产率”是指每升发酵培养基通过发酵每小时产生的丁醇总量。

[0078] 如本文所用,术语“有效产量”指发酵期间生物催化剂消耗每单位可发酵碳底物产生的丁醇量。

[0079] 本文所用术语“有氧条件”是指有氧气存在下的生长条件。

[0080] 本文所用术语“微氧条件”是指有低水平的氧气(即低于正常的大气氧气水平)存在的生长条件。

[0081] 本文所用术语“厌氧条件”是指不存在氧气的生长条件。

[0082] 本文所用术语“基本培养基”是指包含能容许生长的最低限度的营养物质的生长培养基,其通常不含氨基酸。基本培养基典型地包含可发酵碳源和多种可随微生物和生长条件的不同而不同的盐类;这些盐通常提供了必需元素如镁、氮、磷和硫,从而允许微生物合成蛋白质和核酸。

[0083] 本文所用术语“组合培养基”,是指存在的所有成分量均已知的生长培养基,例如,微生物所需的碳源、氮源以及痕量元素和维生素均为确定的。

[0084] 本文所用术语“生物相容性”是指微生物萃取剂的存在下利用葡萄糖的能力的度量。生物可相容的萃取剂允许微生物利用葡萄糖。生物不相容的(即生物毒性的)萃取剂不允许微生物利用葡萄糖,例如以比当该萃取剂不存在时的速率的 25% 更高的速率。

[0085] 术语“°C”指摄氏度。

[0086] 术语“OD”是指光密度。

[0087] 术语“OD₆₀₀”是指波长为 600nm 时的光密度。

[0088] 术语 ATCC 是指美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA。

[0089] 术语“sec”是指秒。

[0090] 术语“min”是指分钟。

[0091] 术语“h”是指小时。

[0092] 术语“mL”是指毫升。

[0093] 术语“L”是指升。

[0094] 术语“g”是指克。

[0095] 术语“mmol”是指毫摩尔。

[0096] 术语“M”是指摩尔浓度。

[0097] 术语“ μL ”是指微升。

[0098] 术语“ μg ”是指微克。

[0099] 术语“ $\mu\text{g/mL}$ ”是指微克每升。

[0100] 术语“ mL/min ”是指毫升每分钟。

[0101] 术语“ g/L ”是指克每升。

[0102] 术语“ g/L/h ”是指克每升每小时。

[0103] 术语“ mmol/min/mg ”是指毫摩尔每分钟每毫克。

[0104] 术语“temp”是指温度。

[0105] 术语“rpm”是指每分钟转数。

[0106] 术语“HPLC”是指高压液相色谱法。

[0107] 术语“GC”是指气相色谱法。

[0108] 为所有目的,所有的出版物、专利、专利申请、以及本文提及的其它参考资料均全文以引用方式并入本文。此外,当数量、浓度或其它数值或参数以范围、优选范围或优选上限数值和优选下限数值的列表形式给出时,其应被理解为具体地公开由任何范围上限或优选数值和任何范围下限或优选数值的任何一对所构成的所有范围,而不管所述范围是否被单独地公开。除非另行指出,凡在本文中给出某一数值范围之处,该范围均旨在包含其端点,以及位于该范围内的所有整数和分数。当定义范围时,不旨在将本发明的范围限定于所列举的具体值。

[0109] 经基因修饰的微生物

[0110] 用于生产丁醇的微生物宿主可以选自细菌、蓝细菌、丝状真菌和酵母。所使用的微生物宿主应能耐受所产生的丁醇产物,以使产量不受产物对宿主的毒性限制。用于丁醇生产的微生物宿主的选择详述如下。

[0111] 在高滴度水平的丁醇存在下具有代谢活性的微生物并不为本领域所熟知。尽管已从产溶剂梭菌 (solventogenic Clostridia) 中分离了丁醇耐受性突变体,但有关其他潜在可用的细菌菌株的丁醇耐受性方面的信息几乎没有。关于细菌中醇耐受性的比较的大部分研究表明,丁醇的毒性大于乙醇 (de Cavalho 等人, Microsc. Res. Tech. 64 : 215-22 (2004) 和 Kabelitz 等人, FEMS Microbiol. Lett. 220 : 223-227 (2003))。Tomas 等人 (J. Bacteriol. 186 : 2006-2018 (2004)) 报导称丙酮丁醇梭菌在发酵过程中的 1- 丁醇产量可能受丁醇毒性限制。1- 丁醇对丙酮丁醇梭菌的主要影响是破坏膜功能 (Hermann 等人, Appl. Environ. Microbiol. 50 : 1238-1243 (1985))。

[0112] 被选用于丁醇生产的微生物宿主应能耐受丁醇,并应能利用引入的生物合成途径将碳水化合物转化为丁醇,如下所述。选择合适微生物宿主的标准包括如下:对丁醇的内在耐受,高效率的碳水化合物利用,用于基因操作的遗传工具的可用性,以及产生稳定的染色体变化的能力。

[0113] 对丁醇具有耐受性的适当的宿主菌株,可以通过基于该菌株的内在耐受性的筛选而得到鉴定。微生物对丁醇的内在耐受性,可以通过测定当其于基本培养基中生长时,导致生长速率被抑制 50% 的丁醇浓度 (IC_{50}) 而得到测量。 IC_{50} 值可以利用本领域已知的方法来确定。例如,可以在不同量的丁醇的存在下培养所感兴趣的微生物,并通过测量 600 纳米下的光密度监测生长速率。倍增时间可以从生长曲线的对数部分计算并用作生长率的量

度。导致生长受到 50%抑制的丁醇浓度,可以通过生长受抑制的百分比对丁醇浓度的作图而得到测定。优选地,宿主菌株将具有大于约 0.5%的丁醇 IC₅₀。具有大于约 1.5%的丁醇 IC₅₀ 的宿主菌株是较合适的。具有大于约 2.5%的丁醇 IC₅₀ 的宿主菌株是尤其合适的。

[0114] 用于丁醇生产的微生物宿主还应以高效率利用葡萄糖和 / 或其他碳水化合物。大多数微生物都能够利用碳水化合物。但是,某些环境微生物不能有效地利用碳水化合物,因此不是适当的宿主。

[0115] 在基因方面修饰宿主的能力对任何重组微生物的产生来说十分关键。可使用的转基因技术的模式包括电穿孔、接合、转导或自然转化。可利用多种宿主接合性质粒和药物抗性标记。用于微生物的克隆载体系基于能在该宿主微生物中起作用的抗生素抗性标记的性质而针对该宿主特别设计的。

[0116] 微生物宿主还可以是经过调控,以通过使多个基因失活而使碳流竞争性途径失活的。这需要有转座子或染色体整合载体来指导失活作用。此外,能经受化学诱变的生产宿主还可通过进行化学诱变和突变体筛选获得对丁醇的内在耐受性方面的改进。

[0117] 例如灭活碳流的竞争性途径,可减少或除去丙酮酸脱羧酶(参见例如美国公布专利申请 20090305363。)在多个实施方案中,丁醇是微生物的主要产物。在多个实施方案中,微生物不产生丙酮。

[0118] 基于上述标准,用于生产丁醇的合适微生物宿主包括但不限于以下属成员:发酵单胞菌属(*Zymomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、伊萨酵母属(*Issatchenkia*)和糖酵母属(*Saccharomyces*)。优选的宿主包括:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、红串红球菌(*Pseudomonas putida*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、鹌鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0119] 上述微生物可以用本领域已知的方法进行过基因修饰以将可发酵碳源转化为丁醇的,其中所述丁醇具体而言包括 1-丁醇、2-丁醇或异丁醇。适合的微生物包括埃希氏菌属、乳杆菌属和糖酵母属。合适的微生物包括大肠杆菌、植物乳杆菌和啤酒糖酵母(*S. cerevisiae*)。此外,所述微生物还可以是以上所列微生物之一的用 Bramucci 等人所述的方法(美国专利申请 11/761497;和 WO 2007/146377)分离的丁醇耐受的菌株。一种这样的菌株的例子是植物乳杆菌菌株 PN0512(ATCC:PTA-7727,于 2006 年 7 月 12 日因美国专利申请 11/761497 进行生物保藏)。

[0120] 用于生产丁醇的适当的生物合成途径是本领域中已知的,并且某些适当的途径描

述于本文中。在一些实施方案中,所述丁醇生物合成途径包含至少一种对宿主细胞是异源的基因。在一些实施方案中,所述丁醇生物合成途径包含一种以上对宿主细胞是异源的基因。在一些实施方案中,所述丁醇生物合成途径包含异源基因,所述异源基因编码的多肽对应于生物合成途径的每一步骤。

[0121] 同样地,本文描述了具有催化所指示的底物向产物的转化的能力的某些适当的蛋白质,并且本领域中提供了其他适当的蛋白质。例如,美国专利申请公布 US20080261230、US20090163376 和 US20100197519 描述了乙酰羟酸异构还原酶,提交于 2010 年 9 月 29 日的美国专利申请序列号 12/893,077 也描述了这种酶;美国专利申请公布 20100081154 描述了二羟酸脱水酶;美国专利申请公布 US20090269823 和美国临时专利申请 61/290636 描述了醇脱氢酶。

[0122] 微生物可经基因修饰以包含制备 1- 丁醇的 1- 丁醇生物合成途径。合适的修饰包括 Donaldson 等人在 WO 2007/041269 中所述的那些,该文献以引用方式并入本文。例如,所述微生物可经基因修饰以表达 1- 丁醇生物合成途径,所述途径包括下列酶催化底物至产物的转化:

[0123] a) 乙酰 -CoA 至乙酰乙酰 -CoA;

[0124] b) 乙酰乙酰 -CoA 至 3- 羟丁酸 -CoA;

[0125] c) 3- 羟丁酸 -CoA 至丁烯酰 -CoA;

[0126] d) 丁烯酰 -CoA 至丁酰 -CoA;

[0127] e) 丁酰 -CoA 至丁醛;以及

[0128] f) 丁醛至 a- 丁醇。

[0129] 所述微生物也可经基因修饰以表达制备 2- 丁醇的 2- 丁醇生物合成途径。合适的修饰包括 Donaldson 等人在美国专利公开申请公布 2007/0259410 和 2007/0292927、以及 PCT 申请公布 WO 2007/130518 和 WO 2007/130521 中描述的那些。例如,在一个实施方案中,所述微生物可经基因修饰以表达 2- 丁醇生物合成途径,所述途径包括下列酶催化底物至产物的转化:

[0130] a) 丙酮酸至 α - 乙酰乳酸;

[0131] b) α - 乙酰乳酸至乙偶姻;

[0132] c) 乙偶姻至 2,3- 丁二醇;

[0133] d) 2,3- 丁二醇至 2- 丁酮;以及

[0134] e) 2- 丁酮至 2- 丁醇。

[0135] 所述微生物也可经基因修饰以表达制备异丁醇的异丁醇生物合成途径。合适的修饰包括 Donaldson 等人在美国专利公开申请公布 2007/0092957 和 WO 2007/050671 中描述的那些。例如,所述微生物可经基因修饰以包含异丁醇生物合成途径,所述途径包括下列酶催化底物至产物的转化:

[0136] a) 丙酮酸至乙酰乳酸;

[0137] b) 乙酰乳酸至 2,3- 二羟基异戊酸;

[0138] c) 2,3- 二羟基异戊酸至 α - 酮异戊酸;

[0139] d) α 酮异戊酸至异丁醛;以及

[0140] e) 异丁醛至异丁醇。

[0141] 所述大肠杆菌菌株可包含:(a)由下列基因编码的异丁醇生物合成途径:来自肺炎克雷伯氏菌的 budB(SEQ ID NO:1),其编码乙酰乳酸合酶(列为 SEQ ID NO:2),来自大肠杆菌的 ilvC(列为 SEQ ID NO:3),其编码乙酰羟酸还原异构酶(列为 SEQ ID NO:4),来自大肠杆菌的 ilvD(列为 SEQ ID NO:5),其编码乙酰羟酸脱水酶(列为 SEQ ID NO:6),来自乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 kivD(列为 SEQ ID NO:7),其编码支链酮酸脱羧酶(列为 SEQ ID NO:8),以及来自木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)的 sadB(列为 SEQ ID NO:9),其编码丁醇脱氢酶(列为 SEQ ID NO:10)。所述异丁醇生物合成途径的基因所编码的酶,催化底物向产物的转化,以将丙酮酸转换为异丁醇,如上所述。具体而言,乙酰乳酸合酶催化丙酮酸向乙酰乳酸的转化,乙酰羟酸还原异构酶催化乙酰乳酸向 2,3-二羟基异戊酸的转化,乙酰羟酸脱水酶催化 2,3-二羟基异戊酸向 α -酮异戊酸的转化,支链酮酸脱羧酶催化 α -酮异戊酸向异丁醛的转化,丁醇脱氢酶催化异丁醛向异丁醇的转化。这种重组大肠杆菌菌株能够使用本领域已知的方法(参见未决的美国专利申请 12/478,389 和 12/477,946)和/或本文下述的方法构建。预期可构建包含与本文所述蛋白质序列至少约 70-75%的同一性,至少约 75-80%,至少约 80-85%的同一性,或至少约 85-90%的同一性的合适菌株。

[0142] 大肠杆菌菌株可包含对下列基因的删除以去除限制异丁醇生产的竞争性途径,列为 SEQ ID NO:71 的 pf1B(编码丙酮酸甲酸裂解酶),列为 SEQ ID NO:73 的 IdhA(编码乳酸脱氢酶),列为 SEQ ID NO:77 的 adhE(编码醇脱氢酶);以及至少一种包含 frdABCD 操纵子(编码延胡索酸还原酶)的基因,具体而言,列为 SEQ ID NO:90 的 frdA,列为 SEQ ID NO:75 的 frdB,列为 SEQ ID NO:92 的 frdC 和列为 SEQ ID NO:94 的 frdD。

[0143] 啤酒糖酵母菌株可包含:由下列基因编码的异丁醇生物合成途径:来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 alsS 编码区(SEQ ID NO:11),其编码乙酰乳酸合酶(SEQ ID NO:12),来自啤酒糖酵母(*S. cerevisiae*)的 ILV5(SEQ ID NO:13),其编码乙酰羟酸还原异构酶(KARI;SEQ ID NO:14)和/或突变的 KARI 如 Pf5. IlvC-Z4B8(SEQ ID NO:15;蛋白质 SEQ ID NO:16)所编码的,来自变异链球菌(*Streptococcus mutans*)的 ilvD(SEQ ID NO:17),其编码乙酰羟酸脱水酶(SEQ ID NO:18),来自枯草芽孢杆菌的 kivD(经密码子优化的序列,列为 SEQ ID NO:19),其编码支链酮酸脱羧酶(SEQ ID NO:20),以及来自木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)的 sadB(SEQ ID NO:9),其编码丁醇脱氢酶(SEQ ID NO:10)。所述异丁醇生物合成途径的基因所编码的酶,催化将丙酮酸转换为异丁醇所需的底物向产物的转化,如本文所述。预期可构建合适的菌株,其包含的序列与本文所述的氨基酸序列具有至少约 70-75%的同一性,至少约 75-80%,至少约 80-85%的同一性,或至少约 85-90%的同一性。

[0144] 在美国专利申请 12/477,942 中描述了表达异丁醇途径的酵母菌株,其在胞质溶胶中具有乙酰乳酸合酶(ALS)活性,并且具有内源丙酮酸脱羧酶(PDC)基因的缺失。胞质的 ALS 和降低的 PDC 表达的组合已经被发现大大提高了从丙酮酸至乙酰乳酸的流量,乙酰乳酸进而流向产生丁醇的途径。此类重组啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株可使用本领域已知的方法和/或本文所述方法进行构建。其他合适的酵母菌株是本领域已知的。在美国临时申请序列号 61/379546、61/380563 和美国专利申请序列号 12/893089 中提供了附加的实例。

[0145] 与本文提供方法联合使用的适用于微生物的附加修饰包括如美国专利申请公布 20090305363 所述用于降低甘油 3-磷酸脱氢酶活性的修饰、通过 Entner-Doudoroff 途径提供提高的碳流量的宿主细胞修饰或如美国专利申请公布 20100120105 所述的降低等效平衡。具有活性提高的异源蛋白（其需要结合铁硫簇以获得它们的活性）的酵母菌株在美国专利申请公布 20100081179 中进行了描述。其他修饰包括在编码具有双功能己糖激酶活性的多肽的内源多核苷酸中的修饰，如美国临时申请 61/290,639 所述，整合至少一个多核苷酸的修饰，所述多核苷酸编码催化利用丙酮酸的生物合成途径中的步骤的多肽，如美国临时申请 61/380563 所述。

[0146] 此外，在编码影响铁硫簇生物合成的多肽的内源性基因中包含至少一个缺失、突变和 / 或取代的宿主细胞在美国临时专利申请 61/305333 中进行了描述，并且包含编码具有磷酸酮醇酶活性的多肽的异源多核苷酸的宿主细胞和包含编码具有磷酸转乙酰酶活性的多肽的异源多核苷酸的宿主细胞在美国临时专利申请 61/356379 中进行了描述。

[0147] 合适的酵母菌株的构建

[0148] NGI-049 是合适啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株的实例。NGI-049 是含内源性 PDC1、PDC5 和 PDC6 基因的插入失活，并且包含表达载体 pLH475-Z4B8 和 pLH468 的菌株。PDC1、PDC5 和 PDC6 基因编码丙酮酸脱羧酶的三种主要的同功酶。该菌株表达编码异丁醇生物合成途径的酶的基因，所述基因为整合的或者位于质粒上。本文提供了 NGI-049 菌株的构建。

[0149] 酵母中的内源丙酮酸脱羧酶活性将丙酮酸转化成乙醛，然后将其转化成乙醇或经由乙酸转化成乙酰 -CoA。因此，内源丙酮酸脱羧酶活性是减少或消除副产物形成的目标。

[0150] 已经报道了具有由于丙酮酸脱羧酶编码基因的破坏导致丙酮酸脱羧酶活性降低的其他酵母菌株的实例，例如 Flikweert 等人 (*Yeast* (1996) 12 :247-257) 报道的糖酵母属 (*Saccharomyces*)、Bianchi 等人 (*Mol. Microbiol.* (1996) 19(1) :27-36) 报道的克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)，以及 Hohmann (*Mol Gen Genet.* (1993) 241 :657-666) 报道的调节基因的破坏。不具有丙酮酸脱羧酶活性的糖酵母属 (*Saccharomyces*) 菌株得自 ATCC (Accession#200027 和 #200028)。

[0151] pdcc6::GPM1-sadB 整合盒和 PDC6 删除的构建：

[0152] 通过将来自 pRS425::GPM-sadB (SEQ ID NO :63) 的 GPM-sadB-ADH1t 片段 (SEQ ID NO :21)，与来自 pUC19-URA3r 的 URA3r 基因相联，构建了 pdcc6::GPM1p-sadB-ADH1t-URA3r 整合盒。pUC19-URA3r (SEQ ID NO :22) 包含来自 pRS426 (ATCC#77107) 的 URA3 标记，该标记两翼为 75bp 的同源重复序列，以允许体内同源重组和 URA3 标记的移除。以 pRS425::GPM-sadB 和 pUC19-URA3r 质粒 DNA 作为模板，利用 Phusion DNA 聚合酶 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; 目录号 F-540S) 和引物 114117-11A 至 114117-11D (SEQ ID NO :23、24、25 和 26) 以及 114117-13A 和 114117-13B (SEQ ID NO :27 和 28)，通过重叠延伸 PCR (SOE PCR) (如 Horton 等人 (1989) *Gene* 77 :61-68 所述) 将上述两种 DNA 片段相连。

[0153] SOE PCR 的外侧引物 (114117-13A 和 114117-13B) 包含 5' 和 3' ~ 50bp 分别与 PDC6 启动子和终止子的上游和下游区域同源的区域。利用标准的遗传学技术 (*Methods in Yeast Genetics*, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

NY, 第 201-202 页), 将完整的盒 PCR 片段转入了 BY4700(ATCC#200866), 并将转化体在 30℃ 培养于不含尿嘧啶且补充了 2% 葡萄糖的合成的完全培养基上。利用引物 112590-34G 和 112590-34H(SEQ ID NO:30 和 31), 以及 112590-34F 和 112590-49E(SEQ ID NO:29 和 32), 通过 PCR 对转化体进行了筛选, 以验证 PDC6 编码区的删除在 PDC6 基因座处的整合。通过按照标准规程在 30℃ 涂布于补充了 2% 葡萄糖和 5-FOA 的合成的完全培养基上, 对上述 URA3r 标记进行了回收利用。通过将来自上述 5-FOA 平板的菌落接种至 SD-URA 培养基上, 生长的被抑制确认了标记的移除。得到的经过鉴定的菌株具有下列基因型: BY4700pdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t。

[0154] pdc1::PDC1-ilvD 整合盒和 PDC1 删除的构建:

[0155] 利用 SOE PCR 如 Horton 等人 (1989) Gene 77:61-68 所述, 通过将来自 pLH468 的 ilvD-FBA1t 片段 (SEQ ID NO:33) 与来自 pUC19-URA3r 的 URA3r 基因相连, 构建了 pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t-URA3r 整合盒, 其中所述 SOE PCR 用 pLH468 和 pUC19-URA3r 质粒 DNA 作为模板, 利用 Phusion DNA 聚合酶 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA; 目录号 F-540S) 和引物 114117-27A 至 114117-27D(SEQ ID NO:34、35、36 和 37) 进行。

[0156] SOE PCR 的外侧引物 (114117-27A 和 114117-27D) 包含 5' 和 3' ~ 50bp 与 PDC1 启动子的下游区域和 PDC1 编码区的下游区域同源的区域。利用标准的遗传学技术 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 第 201-202 页), 将完整的盒 PCR 片段转入了 BY4700 pdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t, 并将转化体在 30℃ 培养于不含尿嘧啶且补充了 2% 葡萄糖的合成的完全培养基上。利用引物 114117-36D 和 135(SEQ ID NO 38 和 39), 以及 112590-49E 和 112590-30F(SEQ ID NO 32 和 40), 通过 PCR 对转化体进行了筛选, 以验证 PDC1 编码区的删除在 PDC1 基因座处的整合。通过按照标准规程在 30℃ 涂布于补充了 2% 葡萄糖和 5-FOA 的合成的完全培养基上, 对上述 URA3r 标记进行了回收利用。通过将来自上述 5-FOA 平板的菌落接种至 SD-URA 培养基上, 生长的被抑制确认了标记的移除。得到的经过鉴定的菌株“NYLA67”具有下列基因型: BY4700pdc6::GPM1p-sadB-ADH1tpdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t。

[0157] HIS3 删除

[0158] 为了删除内源的 HIS3 编码区, 从 URA3r2 模板 DNA(SEQ ID NO:41)PCR 扩增了 his3::URA3r2 盒。URA3r2 包含来自 pRS426(ATCC#77107) 的 URA3 标记, 该标记两翼为 500bp 的同源重复序列, 以允许体内同源重组和 URA3 标记的移除。PCR 系利用 Phusion DNA 聚合酶和引物 114117-45A 和 114117-45B(SEQ ID NO:42 和 43) 进行, 其产生了 ~ 2.3kb 的 PCR 产物。每种引物的 HIS3 部分来源于 HIS3 启动子上游的 5' 区域和编码区下游的 3' 区域, 如此 URA3r2 标记的整合导致 HIS3 编码区的置换。利用标准遗传学技术 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 第 201-202 页), 将 PCR 产物转化到 NYLA67 中, 并将转化体在 30℃ 培养于不含尿嘧啶且补充了 2% 葡萄糖的合成完全培养基上。通过在 30℃ 下将转化子重复接种到缺乏组氨酸并补充有 2% 葡萄糖的合成完全培养基上来筛选转化子以验证整合正确。通过按照标准规程在 30℃ 下置于补充有 2% 葡萄糖和 5-FOA 的合成完全培养基上再利用 URA3r 标记。通过将来自上述 5-FOA 平板的菌落接种至 SD-URA 培养基上, 生长的被抑制确认了标记的移除。得到的经过鉴定的菌株“NYLA73”具有下列基因型: BY4700 pdc6::GPM1p-sadB-ADH1tpdc1::PD

Clp-ilvD-FBA1t Δ his3。

[0159] pd_c5::kanMX 整合盒和 PDC5 删除的构建：

[0160] 利用 Phusion DNA 聚合酶和引物 PDC5::KanMXF 和 PDC5::KanMXR (SEQ ID NO:44 和 45), 从菌株 YLR134W 染色体 DNA (ATCC No. 4034091) PCR 扩增了 pd_c5::kanMX4 盒, 产生了 ~2.2kb 的 PCR 产物。每种引物的 PDC5 部分来源于 PDC5 启动子上游的 5' 区域和编码区下游的 3' 区域, 如此 kanMX4 标记的整合导致 PDC5 编码区的置换。使用标准遗传技术 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 第 201-202 页) 将 PCR 产物转化到 NYLA73 中, 并且在补充有 1% 乙醇和遗传霉素 (200 μ g/ml) 的 YP 培养基上, 在 30°C 下选择转化子。使用引物 PDC5ko_{for} 和 N175 (SEQ ID NO:46 和 47) 的 PCR 筛选转化子以验证在 PDC 基因座上发生的 PDC5 编码区取代整合正确。经鉴定的正确的转化体具有下列基因型: BY4700pd_c6::GPM1p-sadB-ADH1tpd_c1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δ his3 pd_c5::kanMX4。

[0161] pLH475-Z4B8 构建

[0162] 构建 pLH475-Z4B8 质粒 (SEQ ID NO:48), 以在酵母中表达 ALS 和 KARI。pLH475-Z4B8 是包含下列嵌合基因的 pHR81 载体 (ATCC#87541)：

[0163] 1) CUP1 启动子 (SEQ ID NO:49), 来自枯草芽孢杆菌的乙酰乳酸合酶编码区 (AlsS; SEQ ID NO:11; 蛋白质 SEQ ID NO:12) 和 CYC1 终止子 (CYC1-2; SEQ ID NO:50)；

[0164] 2) ILV5 启动子 (SEQ ID NO:51)、Pf5. IlvC-Z4B8 编码区 (SEQ ID NO:15; 蛋白质 SEQ ID NO:16) 和 ILV5 终止子 (SEQ ID NO:52)；以及 3) FBA1 启动子 (SEQ ID NO:53)、啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 的 KARI 编码区 (ILV5; SEQ ID NO:13; 蛋白质 SEQ ID NO:14) 和 CYC1 终止子 (SEQ ID NO:54)。

[0165] 所述 Pf5. IlvC-Z4B8 编码区系编码来自荧光假单胞菌的 KARI 但包含突变的序列, 其被描述于美国专利申请公布 US20090163376 中, 该专利以引用方式并入本文。上述 Pf5. IlvC-Z4B8 编码的 KARI (SEQ ID NO:16) 与野生型荧光假单胞菌 KARI 相比, 具有下列的氨基酸变换：

[0166] C33L: 位于位点 33 的半胱氨酸变为亮氨酸,

[0167] R47Y: 位于位点 47 的精氨酸变为酪氨酸,

[0168] S50A: 位于位点 50 的丝氨酸变为丙氨酸,

[0169] T52D: 位于位点 52 的苏氨酸变为天冬酰胺,

[0170] V53A: 位于位点 53 的缬氨酸变为丙氨酸,

[0171] L61F: 位于位点 61 的亮氨酸变为苯丙氨酸,

[0172] T80I: 位于位点 80 的苏氨酸变为异亮氨酸,

[0173] A156V: 位于位点 156 的丙氨酸变为苏氨酸, 以及

[0174] G170A: 位于位点 170 的甘氨酸变为丙氨酸。

[0175] 上述 Pf5. IlvC-Z4B8 编码区是基于针对在啤酒糖酵母中的表达优化的密码子, 利用 DNA 2.0 (Palo Alto, CA; SEQ ID NO:15) 合成的。

[0176] 表达载体 pLH468

[0177] 构建了用于在酵母中表达 DHAD、KivD 和 HADH 的质粒 pLH468 (SEQ ID NO:55)。

[0178] 基于针对在啤酒糖酵母中的表达优化的密码子, 利用 DNA2.0 合成了枯草芽孢杆

菌酮异戊酸脱羧酶 (KivD) 和马肝脏醇脱氢酶 (HADH) 的编码区 (分别为 SEQ ID NO:19 和 56), 并提供于质粒 pKivDy-DNA2.0 和 pHadhy-DNA2.0 中。所编码的蛋白质分别为 SEQ ID NO:20 和 57。构建了 KivD 和 HADH 单独的表达载体。用 AscI 和 SfiI 酶对载体 pNY8(SEQ ID NO:58; 也称为 pRS426.GPD-ald-GPDt, 描述于美国专利申请公布 US20080182308, 实施例 17, 该专利以引用方式并入本文) 进行了消化, 从而切下 GPD1 启动子 (SEQ ID NO:59) 和 ald 编码区, 以装配 pLH467(pRS426::P_{GPD1}-kivDy-GPD1t)。用 5' 引物 OT1068 和 3' 引物 OT1067(SEQ ID NO:61 和 62) 对来自 pNY8 的 GPD1 启动子片段 (GPD1-2; SEQ ID NO:60) 进行了 PCR 扩增, 以在 5' 端加上 AscI 位点, 并在 3' 端加上 SpeI 位点。将上述经 AscI/SfiI 消化的 pNY8 载体片段, 与经 AscI 和 SpeI 消化的 GPD1 启动子 PCR 产物, 以及分离自载体 pKivD-DNA2.0 的包含经密码子优化的 kivD 编码区的 SpeI-SfiI 片段相连接。这种三方连接产生了载体 pLH467(pRS426::P_{GPD1}-kivDy-GPD1t)。通过限制性图谱和测序对 pLH467 进行验证。

[0179] pLH435(pRS425::P_{GPM1}-Hadhy-ADH1t) 源自载体 pRS425::GPM-sadB(SEQ ID NO:63), 后者描述于美国专利申请 12/477942, 实施例 3, 该专利以引用方式并入本文。pRS425::GPM-sadB 是包含了嵌合基因的 pRS425 载体 (ATCC#77106), 所述嵌合基因包含 GPM1 启动子 (SEQ ID NO:64), 来自木糖氧化无色杆菌的丁醇脱氢酶的编码区 (sadB; SEQ ID NO:9; 蛋白质 SEQ ID NO:10; 公开于美国专利申请公布 US20090269823), 以及 ADH1 终止子 (SEQ ID NO:65)。pRS425::GPMp-sadB 在上述 sadB 编码区的 5' 和 3' 端分别包含 BbvI 和 PacI 位点。通过利用引物 OT1074 和 OT1075(SEQ ID NO:66 和 67) 进行定点诱变, 在上述 sadB 编码区的 5' 端加上了 NheI 位点, 从而产生载体 pRS425-GPMp-sadB-NheI, 该载体通过测序验证。用 NheI 和 PacI 消化 pRS425::P_{GPM1}-sadB-NheI 以释放出 sadB 编码区, 并将来自载体 pHadhy-DNA2.0 的包含经密码子优化的 HADH 编码区的 NheI-PacI 片段与上述经消化的质粒连接, 从而得到 pLH435。

[0180] 用 SacI 和 NotI 消化了酵母载体 pRS411(ATCC#87474), 并在三方连接反应中, 将上述经消化的载体与来自 pLH467 的包含 P_{GPD1}-kivDy-GPD1t 表达盒的 SacI-SalI 片段和来自 pLH435 的包含 P_{GPM1}-Hadhy-ADH1t 表达盒的 SalI-NotI 片段相连接, 以将 KivD 和 HADH 表达盒联合于同一载体中。这样就产生了载体 pRS411::P_{GPD1}-kivDy-P_{GPM1}-Hadhy(pLH441), 该载体经过了限制性图谱验证。

[0181] 为了构建下游的异丁醇途径 ilvD、kivDy 和 Hadhy 中的全部三种基因的共表达载体, 我们使用描述于美国专利申请 12/569636 中的 pRS423FBAilvD(链球菌的)(SEQ ID NO:68) 作为 ilvD 基因的来源。这种穿梭载体包含在大肠杆菌中共生所需的 F1 复制起点 (nt 1423 至 1879) 和在酵母中复制所需的 2 微米起点 (nt 8082 至 9426)。该载体含有 FBA 启动子 (nt 2111 至 3108; SEQ ID NO:53) 和 FBA 终止子 (nt 4861 至 5860; SEQ ID NO:69)。此外, 它还携带用于在酵母中进行选择的 His 标记 (nt 504 至 1163) 和用于在大肠杆菌中进行选择的氨苄青霉素抗性标记 (nt 7092 至 7949)。来自变异链球菌 UA159(ATCC#700610) 的 ilvD 编码区 (nt 3116 至 4828; SEQ ID NO:17; 蛋白质 SEQ ID NO:18) 位于上述 FBA 启动子和 FBA 终止子之间, 从而构成了用于表达的嵌合基因。此外, 上述 ilvD 编码区还融合了 lumio 标签 (nt 4829-4849)。

[0182] 第一步是用 SacI 和 SacII 将 pRS423FBA ilvD(Strep)(也叫做

pRS423-FBA(SpeI)-IlvD(变异链球菌(*Streptococcus mutans*))-Lumio)线性化(并利用T4DNA聚合酶将SacII位点平末端化),从而得到全长为9,482bp的载体。第二步是用SacI和KpnI从pLH441分离出kivDy-hADHy盒(并利用T4DNA聚合酶将KpnI位点平末端化),得到6,063bp的片段。将该片段与来自pRS423-FBA(SpeI)-IlvD(变异链球菌(*Streptococcus mutans*))-Lumio的9,482bp载体片段相连接。如此产生了载体pLH468(pRS423::P_{FBA1}-ilvD(Strep)Lumio-FBA1t-P_{GPD1}-kivDy-GPD1t-P_{GPM1}-hadhy-ADH1t),该载体经过了限制性图谱和测序确认。

[0183] 利用标准的遗传学技术(Methods in Yeast Genetics,2005,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY),将质粒载体pLH468和pLH475-Z4B8同时转入了菌株BY4700pdc6::GPM1p-sadB-ADH1tpdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δ his3 pdc5::kanMX4,并将所得菌株在30℃培养于不含组氨酸和尿嘧啶且补充了1%乙醇的合成完全培养基上。所得菌株称为NGI-049。

[0184] 合适的大肠杆菌菌株的构建

[0185] NGCI-031是合适的大肠杆菌菌株实例。NGCI-031是包含异丁醇生物合成途径并缺失pf1B、frdB、ldhA和adhE基因的菌株。本文提供了NGCI-031菌株的构建。

[0186] 构建具有pf1B、frdB、ldhA和adhE基因缺失的大肠杆菌菌株

[0187] 本文提供了从大肠杆菌中去除pf1B、frdB、ldhA和adhE基因的合适方法。大肠杆菌的Keio菌株集(Baba等人,Mol.Syst.Biol.,2:1-11,2006)用于制备八个基因敲除株。Keio菌株集(得自NBRP,National Institute of Genetics,Japan)是在菌株大肠杆菌BW25113中制备的单基因敲除文库,所述制备通过Datsenko和Wanner(Datsenko,K.A.&Wanner,B.L.,Proc Natl Acad Sci.,U S A,97:6640-6645,2000)的方法进行。在该集合中,每个删除的基因被FRT侧接的卡那霉素标记取代,该标记通过Flp重组酶移除。携带多个基因敲除的大肠杆菌菌株通过噬菌体P1从Keio供体菌株转导到受体菌株中移除敲除的卡那霉素标记进行构建。在用于制备敲除的每个P1转导后,通过Flp重组酶移除卡那霉素标记。这种不带标记的菌株被作为下一次P1转导的新的接受菌株。在菌株中使用Datsenko和Wanner(同上)的方法而不是P1转导来直接构建其中一种所述基因敲除。

[0188] 4K0大肠杆菌菌株通过P1_{vir}转导在Keio菌株JW0886中构建,所述转导用自三种Keio菌株制备的P1噬菌体溶菌产物进行。所用的Keio菌株如下:

[0189] -JW0886:插入pf1B中的kan标记

[0190] -JW4114:插入frdB中的kan标记

[0191] -JW1375:插入ldhA中的kan标记

[0192] -JW1228:插入adhE中的kan标记

[0193] [对应于灭活基因的序列为:pf1B(SEQ ID NO:71),frdB(SEQ ID NO:73),ldhA(SEQ ID NO:77),adhE(SEQ ID NO:75)。]

[0194] 用pCP20转化卡那霉素抗性菌株以从染色体中移除侧接FRT的卡那霉素标记,pCP20是氨苄青霉素抗性质粒(Cherepanov和Wackernagel,同上))。将转化体涂覆在包含100 μ g/mL氨苄青霉素的LB板上。质粒pCP20携带酵母FLP重组酶,它在 λ_{PR} 启动子的控制下并且该启动子的表达受位于质粒上的cI857温度敏感阻遏蛋白的控制。pCP20的复制起点也是温度敏感型的。

[0195] 用氨苄青霉素抗性质粒 pJW168 转化卡那霉素抗性菌株以从染色体中移除侧接 loxP 的卡那霉素标记 (Wild 等人, Gene. 223 :55-66, 1998), 所述质粒包含噬菌体 P1Cre 重组酶。Cre 重组酶 (Hoess, R. H. &Abremski, K., 同上) 介导抗卡那霉素基因经由在 loxP 位点上重组的切除。pJW168 的复制起点是温度敏感型 pSC101。将转化体涂覆在包含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 板上。

[0196] 菌株 JW0886 (Δ pf1B::kan) 在 30°C 下用质粒 pCP20 转化并涂布在 LB 平板上, 所述平板包含 100 μ g/mL 氨苄青霉素。然后选择抗氨苄青霉素的转化子, 划线接种到 LB 平板上并在 42°C 下生长。将分离的菌落涂布在氨苄青霉素和卡那霉素选择培养基平板和 LB 平板上。通过菌落 PCR 用引物 pf1BckUp (SEQ ID NO :78) 和 pf1B CkDn (SEQ ID NO :79) 筛选卡那霉素敏感和氨苄青霉素敏感菌落。通过凝胶电泳对 10 μ L 的 PCR 反应混合液等分试样进行了分析。观察预期的大约 0.4kb 的 PCR 产物以确认标记的移除并制备“JW0886 无标记”菌株。该菌株缺失 pf1B 基因。

[0197] 用来自 JW4114 (frdB::kan) 的 P1_{vir} 溶菌产物对上述“JW0886markerless”菌株进行了转导, 并将其涂布接种于包含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上。通过菌落 PCR 用引物 frdB CkUp (SEQ ID NO :80) 和 frdB CkDn (SEQ ID NO :81) 筛选卡那霉素抗性转导物。将生产大约 1.6kb 的期望 PCR 产物的菌落制成电感受态细胞, 并且用 pCP20 转化如上所述移除标记。首先在 30°C 下将转化子涂布在 LB 平板上, 所述平板包含 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 然后选择抗氨苄青霉素的转化子, 划线接种到 LB 平板上并在 42°C 下生长。将分离的菌落涂布在氨苄青霉素和卡那霉素选择培养基平板和 LB 平板上。通过 PCR 用引物 frdB CkUp (SEQ ID NO :80) 和 frdB CkDn (SEQ ID NO :81) 筛选卡那霉素敏感的、氨苄青霉素敏感的菌落。观察到了大约 0.4kb 的目的 PCR 产物, 从而确认了上述标记的移除和双敲除菌株“ Δ pf1B frdB”的构建成功。

[0198] 用来自 JW1375 (Δ ldhA::kan) 的 P1_{vir} 溶菌产物对上述双敲除菌株进行了转导, 并将其涂布于包含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上。利用引物 ldhA CkUp (SEQ ID NO :82) 和 ldhA CkDn (SEQ ID NO :83) 进行菌落 PCR, 对卡那霉素抗性的转导体进行了筛选。如上所述, 将产生了所预期的约 1.5kb 的 PCR 产物的菌落制备为电感受态, 并用 pCP20 对其进行转化以移除标记。在 30°C 下将转化子涂布在 LB 平板上, 所述平板包含 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 并且将抗氨苄青霉素的转化子划线接种到 LB 平板上并在 42°C 下生长。将分离的菌落涂布在氨苄青霉素和卡那霉素选择培养基平板和 LB 平板上。通过菌落 PCR 用引物 ldhA CkUp (SEQ ID NO :82) 和 ldhA CkDn (SEQ ID NO :83) 筛选卡那霉素敏感和氨苄青霉素敏感菌落, 获得 0.3kb 的产物。产生大约 0.3kb 预期产物的克隆证实标记移除并制备三敲除菌株, 它称为“3K0” (Δ pf1B frdB ldhA)。

[0199] 用 P1_{vir} 溶解产物制备菌株“3K0”, 所述溶解产物来自 JW1228 (Δ adhE::kan), 并将其涂覆在包含 25g/mL 卡那霉素的 LB 板上。通过菌落 PCR 用引物 adhE CkUp (SEQ ID NO :84) 和 adhE CkDn (SEQ ID NO :85) 筛选卡那霉素抗性转导产物。产生预期的 1.6kb 的 PCR 产物的克隆称为 3K0 adhE::kan。制成电感受态菌株 3K0 adhE::kan 并用 pCP20 转化以移除标记。在 30°C 下将转化子涂布在 LB 平板上, 所述平板包含 100 μ g/mL 氨苄青霉素。将抗氨苄青霉素的转化子划线接种到 LB 平板上并在 42°C 下生长。将分离的菌落涂布在氨苄青霉素和卡那霉素选择平板和 LB 平板上。通过菌落 PCR 用引物 adhE CkUp (SEQ ID NO :84)

和 adhE CkDn (SEQ ID NO :85) 筛选卡那霉素敏感和氨苄青霉素敏感菌落。将生产预期的大约 0.4kb 的 PCR 产物的克隆命名为“4KO” (Δ pf1B frdB ldhA adhE)。

[0200] 包含异丁醇生物合成途径并缺失 pf1B、frdB、ldhA 和 adhE 基因的大肠杆菌生产宿主 (菌株 NGCI-031) 的构建

[0201] 采用标准条件,从木糖氧化无色杆菌基因组 DNA 中扩增了来自木糖氧化无色杆菌的编码丁醇脱氢酶的 DNA 片段 sadB (DNA SEQ ID NO :9;蛋白质 SEQ ID NO :10)。按照针对革兰氏阴性菌的推荐实验规程,使用 Gentra Puregene 试剂盒 (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN;产品目录号 D-5500A) 制备上述 DNA。分别使用正向和反向引物 N473 和 N469 (SEQ ID NO :86 和 87),用 Phusion High Fidelity DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 完成 PCR 扩增。将 PCR 产物 TOPO-Blunt 克隆至 pCR4BLUNT (Invitrogen),从而得到 pCR4Blunt::sadB,然后将该质粒转入大肠杆菌 Mach-1 细胞。随后从四个克隆中分离质粒并确认序列。

[0202] 然后, sadB 编码区被克隆至载体 pTrc99a (Amann 等人, Gene 69 :301-315, 1988)。用 EcoRI 消化上述 pCR4Blunt::sadB, 释放出 sadB 片段, 将该片段与经 EcoRI 消化的 pTrc99a 连接, 从而形成质粒 pTrc99a::sadB。该质粒被转入大肠杆菌 Mach 1 细胞, 所得到的转化体被命名为 Mach1/pTrc99a::sadB。当使用异丁醛作为底物进行分析时, 从这些细胞中的 sadB 基因中表达的酶活性经测定为在细胞游离提取物中 3.5mmol/min/mg 蛋白。

[0203] 然后如下所述将 sadB 基因亚克隆到 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD 中。pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD 是 pTrc-99a 表达载体, 它携带用于异丁醇表达的操纵子 (如美国专利申请公布 20070092957 实施例 9-14 所述, 该文献以引用方式并入本文)。在 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD 异丁醇操纵子中的第一基因是编码来自肺炎克雷伯氏菌 ATCC 25955 的乙酰乳酸合酶的 budB, 随后是编码来自大肠杆菌的乙酰羟酸异构还原酶的 ilvC 基因。然后是编码来自大肠杆菌的乙酰羟酸脱水酶的 ilvD, 并且最后是编码来自乳酸乳球菌 (*L. lactis*) 的支链酮酸脱羧酶的 kivD 基因。

[0204] 使用引物 N695A (SEQ ID NO :88) 和 N696A (SEQ ID NO :89) 用 Phusion High Fidelity DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 从 pTrc99a::sadB 扩增 sadB 编码区。扩增按以下程序进行: 首先于 98°C 变性 1 分钟, 然后是 98°C 变性 10 秒, 62°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 20 秒, 30 个循环, 然后于 72°C 进行 5 分钟最后的延伸, 最后将温度保持于 4°C。引物 N695A 包含用于克隆的 AvrI 限制性位点和 sadB 编码区的 ATG 起始密码子的 RBS 上游。N696A 引物包含用于克隆的 XbaI 位点。1.1kb 的 PCR 产物用 AvrII 和 XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA) 进行消化, 并使用 Qiaquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 进行凝胶纯化。纯化后的片段使用 T4DNA 连接酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 与用相同限制性酶切后的 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD 连接。连接混合物被置于 16°C 孵育过夜, 然后按照制造商规程转入大肠杆菌 T Mach 1™ 感受态细胞 (Invitrogen)。获得的转化体培养于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。来自转化体的质粒 DNA 用 QIAprep Spinminiprep 试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 按照制造商的规程制备。所得质粒称为 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB。

[0205] 如本文所述制备 4KO 菌株的电感受态细胞并用 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB (“pBCDDB”) 转化。将转化子划线接种到 LB 琼脂平板上, 所述平板包含 100 μ g/mL 氨

芡青霉素。所得携带具有 4K0 的质粒 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB 的菌株称为 NGCI-031。

[0206] 有机萃取剂

[0207] 萃取剂是与水不混溶的有机溶剂或具有使其可用于从发酵液中萃取丁醇的特性的溶剂混合物。合适的有机萃取剂应符合用于生产或回收丁醇的商业两相萃取发酵的理想溶剂的标准。具体而言,所述萃取剂应 (i) 对微生物,例如大肠杆菌、植物乳杆菌和啤酒糖酵母是生物可相容的,(ii) 与发酵培养基大体不混溶,(iii) 对于丁醇的萃取具有高的分配系数(K_p),(iv) 对于营养素的萃取具有低的分配系数,(v) 具有低的与发酵培养基形成乳剂的趋势,和 (vi) 为低成本和无毒害的。此外,为了提高方法的可操作性和经济性,所述萃取剂应 (vii) 具有低的粘度(μ),(viii) 相对于含水的发酵培养基,具有低的密度(ρ),和 (ix) 具有适合对萃取剂和丁醇的下游分离的沸点。

[0208] 在一个实施方案中,萃取剂可为与微生物生物可相容的,即对微生物是无毒的,或者毒性仅至于这样的程度:微生物所受的损害为可接受的水平,使得微生物继续向发酵培养基中生产丁醇产物。萃取剂的生物相容性的程度,能够通过萃取剂和丁醇产物的存在下微生物的葡萄糖利用率确定,如在所定义的发酵条件下所测量的。参见例如美国临时专利申请 61/168,640 ;61/168,642 ;和 61/168,645 的实施例。虽然生物相容的萃取剂允许微生物利用葡萄糖,但非生物相容的萃取剂不允许微生物利用葡萄糖的速率大于例如当所述萃取剂不存在时的速率的约 25%。由于发酵产物丁醇的存在能够影响微生物对萃取剂的敏感度,在对萃取剂的生物相容性的测试过程中应存在发酵产物。附加的发酵产物例如乙醇的存在可类似地影响萃取剂的生物相容性。所述方法期望利用生物相容的萃取剂,其中期望在接触包含具有微生物的发酵液与有机萃取剂后持续生产丁醇。

[0209] 在一个实施方案中,所述萃取剂可选自 C_7 - C_{22} 脂肪醇、 C_7 - C_{22} 脂肪酸、 C_7 - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_7 - C_{22} 脂肪醛、 C_7 - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物。合适萃取剂的实例包括包含至少一种溶剂的萃取剂,所述溶剂选自油醇、二十二醇、鲸蜡醇、月桂醇、十四烷基醇、硬脂醇、油酸、月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、肉豆蔻酸甲酯、油酸甲酯、月桂醛、1- 壬醇、1- 癸醇、1- 十一烷醇、2- 十一烷醇、1- 壬醛、2- 丁基辛醇、2- 丁基 - 辛酸以及它们的混合物。在多个实施方案中,所述萃取剂包括油醇。在多个实施方案中,所述萃取剂包括支链饱和醇,例如 2- 丁基辛醇,其可以 ISOFAL® 12 (Sasol, Houston, TX) 或 Jarcol I-12 (Jarchem Industries, Inc., Newark, NJ) 商购获得。在多个实施方案中,所述萃取剂包括支链羧酸例如 2- 丁基 - 辛酸、2- 己基 - 癸酸或 2- 癸基 - 十四酸,它们可分别以 ISOCARB® 12、ISOCARE® 16 和 ISOCARE® 24 商购获得 (Sasol, Houston, TX)。

[0210] 在一个实施方案中,第一与水不混溶的有机萃取剂可选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物。合适的第一萃取剂还可选自油醇、二十二醇、鲸蜡醇、也称作 1- 十二烷醇的月桂醇、十四烷基醇、硬脂醇、油酸、月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、肉豆蔻酸甲酯、油酸甲酯、月桂醛、以及它们的混合物。在一个实施方案中,所述萃取剂可包括油醇。

[0211] 在一个实施方案中,任选的第二与水不混溶的有机萃取剂可选自 C_7 - C_{22} 脂肪醇、 C_7 - C_{22} 脂肪酸、 C_7 - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_7 - C_{22} 脂肪醛、 C_7 - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物。合适的第二萃取剂还可选自 1- 壬醇、1- 癸醇、1- 十一烷醇、2- 十一烷醇、1- 壬醛、以及它们的

混合物。在一个实施方案中,所述第二萃取剂包括 1- 癸醇。

[0212] 在一个实施方案中,所述第一萃取剂包括油醇并且所述第二萃取剂包括 1- 癸醇。

[0213] 当使用第一和第二萃取剂时,每种萃取剂的相对量可在合适范围内变化。例如,第一萃取剂的用量可为第一和第二萃取剂混合体积的约百分之 30 至约百分之 90,或约百分之 40 至约百分之 80,或约百分之 45 至约百分之 75,或约百分之 50 至约百分之 70。最佳的范围反映了萃取剂特性的最大化,例如相对高的丁醇分配系数与可接受水平的生物相容性之间的平衡。就用于生产或回收丁醇的两相萃取发酵而言,温度、接触时间、发酵培养基中的丁醇浓度、萃取剂和发酵培养基的相对量、具体使用的第一和第二萃取剂、第一和第二萃取剂的相对量、其他有机溶质(包括不同类型和浓度的渗透物)的存在、以及微生物的量和类型是相关的;因此必要时可在适当的范围内调整这些变量以使如本文所述的萃取过程最优化。

[0214] 合适有机萃取剂可有多种商品化来源,例如 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 其商品有多种等级,其中许多可适用于生产或回收丁醇的萃取发酵。工业级的溶剂可包含化合物的混合物,包括所期望的组分以及较高和较低分子量的组分。例如,一种可商购获得的工业级油醇包含约 65% 的油醇以及高级和低级脂肪醇的混合物。

[0215] 渗透物

[0216] 如本发明方法所述,所述发酵培养基包含至少一种渗透物,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。所述渗透物可包括基础发酵培养基的一种或多种组分,例如葡萄糖,在这种情况下存在的渗透物浓度高于基础发酵培养基中包含的渗透物(例如葡萄糖)浓度。除基础发酵培养基中包含的任何可发酵碳源之外,所述渗透物还可包括发酵培养基中存在的任选的可发酵碳源,例如木糖,在这种情况下存在的渗透物浓度高于发酵培养基中的任选的可发酵碳源的浓度。如上文定义部分所定义的渗透物可包括一种或多种有机底物,它们不存在于基础发酵培养基中或者一般不被认为是可发酵碳源如聚乙二醇。基础发酵培养基可包含可发酵碳源如单糖并且一般为特定微生物定制。基础发酵培养基的建议组成可见于 Difco™&BBL™ 手册 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA)。

[0217] 所述渗透物可包括单糖、二糖、甘油、甘蔗汁、糖蜜、聚乙二醇、葡聚糖、高果糖玉米糖浆、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。例如,所述渗透物可包括单糖,所述单糖选自甘油醛、赤藓糖、苏阿糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、二羟基丙酮、赤藓酮糖、核酮糖、木酮糖、阿洛酮糖、果糖、山梨糖、塔格糖、以及它们的组合。例如所述渗透物可包括二糖,所述二糖选自蔗糖、乳果糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、曲二糖、黑曲霉二糖、异麦芽糖、槐糖、昆布二糖、龙胆二糖、松二糖、麦芽酮糖、帕拉金糖、gentiobiulose、甘露二糖、蜜二糖、车前二糖、芸香二糖、rutinulose、木乙糖、以及它们的组合。所述渗透物可选自聚乙二醇、葡聚糖、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。在选自这组的渗透物中应选择分子量足够高的渗透物使得它们不能够透入微生物细胞。例如期望至少 8000 道尔顿的分子量的渗透物,其选自聚乙二醇、葡聚糖、玉米醪、淀粉、纤维素、以及它们的组合。

[0218] 不同等级的渗透物可从多个来源商购获得,它们中的多个可适用于萃取发酵以通过本文所公开的方法生产或回收丁醇。可通过本领域已知的方法或其他物理或化学方法

如沉淀、结晶和 / 或蒸发从发酵培养基与萃取剂接触形成的发酵培养基或水相中回收渗透物。回收的渗透物可用于随后的发酵。在一个实施方案中,渗透物可获取自发酵碳水化合物底物如来自例如水解玉米醪的葡萄糖。

[0219] 渗透物的量需要达到在发酵培养基中的浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数,所述量可根据例如本文下文实施例公开的方法进行测定。例如通过实验测定对分配系数具有正效应的渗透物浓度范围。也测定了展示与受关注的微生物具有可接受的生物相容性的渗透物浓度范围。然后从这两个范围的重叠范围中选择合适的渗透物浓度范围,使得对丁醇分配系数具有正效应所需的渗透物的量与提供可接受的微生物生物相容性水平的浓度范围平衡。经济上的考虑也可作为选择使用的渗透物量的因素。

[0220] 在一个实施方案中,存在于发酵培养基中的渗透物浓度可与微生物生物相容,即,对微生物无毒性或毒性仅达到将微生物减少到可接受水平的程度,以便微生物在渗透物的存在下在发酵培养基中继续生产丁醇产物。渗透物的生物相容性程度可通过在不同浓度渗透物的存在下微生物的生长速率进行测定。尽管生物相容的渗透物浓度允许微生物利用葡萄糖或另一种碳源或生长,但非生物相容的渗透物浓度不允许微生物利用葡萄糖或另一种碳源或以大于例如当不存在过量渗透物时的生长速率约 25% 的生长速率生长。存在的发酵产物如丁醇也可影响与微生物具有生物相容性的渗透物浓度范围。期望方法使用具有生物相容性的浓度范围内的渗透物,其中在包含微生物的发酵培养基与渗透物接触后丁醇的持续生产是必需的。在其中包含微生物的发酵培养基与渗透物接触后不需要持续生产丁醇的方法中,可使用与微生物具有非常小(如果有的话)的生物相容性的渗透物浓度范围。

[0221] 为了使发酵培养基中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数,可在微生物生长期间、丁醇生产期间、当丁醇浓度发生抑制时将渗透物加入到发酵培养基中或双相发酵培养基的水相中、或它们的组合中。可将渗透物加入到第一萃取剂、第二萃取剂、或它们的组合中。可以固体、浆液、或水溶液形式加入渗透物。任选地,可将渗透物加入到发酵培养基和萃取剂中。渗透物可以连续的、半连续的、或分批方式加入。可将渗透物加入到它被导入的整体流如进入发酵罐的整体发酵培养基中,或者加入到来自一个或多个容器的部分流中,例如来自发酵罐的部分流中。

[0222] 在多个实施方案中,发酵培养基中的渗透物总浓度为至少约 0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1M、或 2M。在一些实施方案中,发酵中的渗透物总浓度小于约 5M。

[0223] 发酵

[0224] 可于适当的发酵罐内在适当的发酵培养基中培养所述微生物以生产丁醇。可使用任何适当的发酵罐,包括搅拌槽发酵罐,气升式发酵罐,气泡发酵罐,或它们的任何组合。用于微生物培养物的维持和生长的材料和方法,为微生物学或发酵科学领域的技术人员所熟知(例如参见 Bailey 等人 Biochemical Engineering Fundamentals, 第二版, McGraw Hill, New York, 1986)。基于所述的微生物、发酵和方法的具体要求,必须考虑适当的发酵培养基、pH、温度以及对有氧、微氧和厌氧条件的需求。对所使用的发酵培养基要求并不严格,但其必须支持所使用的微生物的生长并活化生产所期望的丁醇产品所必需的生物合成

途径。可使用常规的发酵培养基,包括但不限于,包含有机氮源如酵母提取物或蛋白胨和至少一种可发酵碳源的复合培养基;基本培养基;以及组合培养基。适当的可发酵碳源包括但不限于:单糖,如葡萄糖或果糖;二糖,如乳糖或蔗糖;低聚糖;多糖,如淀粉或纤维素;一碳底物;以及它们的混合物。除上述适当的碳源之外,所述发酵培养基还可包含适当的氮源如铵盐,酵母提取物或蛋白胨,矿物质,盐类,辅因子,缓冲液以及其他组分,如本领域的技术人员所已知(Bailey 等人,见上文)。所述萃取发酵的适当条件依赖于所使用的具体微生物,并且本领域的技术人员可采用常规实验方便地予以确定。

[0225] 使用具有加入渗透物的萃取发酵回收丁醇的方法

[0226] 可从包含丁醇、水、至少一种渗透物、任选地至少一种可发酵碳源和经基因修饰(即经遗传工程的)以经由生物合成途径从至少一种碳源中生产丁醇的微生物的发酵培养基中回收丁醇,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。此类经基因修饰的微生物可选自细菌、蓝细菌、丝状真菌和酵母,并且包括例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。该方法的一个步骤是使发酵培养基与第一与水不混溶的有机萃取剂和任选的第二与水不混溶的有机萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。“接触”指发酵培养基和有机萃取剂或其溶剂组分在发酵过程期间的任何时间上发生物理接触。可将渗透物加入发酵培养基、第一萃取剂、任选的第二萃取剂、或它们的组合。在一个实施方案中,所述发酵培养基还包含乙醇,并且所述含丁醇有机相可包含乙醇。

[0227] 当使用第一和第二萃取剂时,可以用之前已经混合的第一和第二萃取剂进行接触。例如,可以在例如混合槽的容器中将第一和第二萃取剂混合,并且然后将混合萃取剂加入包含发酵培养基的容器中。作为另外一种选择,接触可以第一和第二萃取剂在接触过程中合并的方式进行。例如,第一和第二萃取剂可以分别地被加入含有发酵培养基的容器。在一个实施方案中,使发酵培养基与有机萃取剂接触还包括,在使发酵培养基和第一萃取剂与第二萃取剂接触之前,先使发酵培养基与第一萃取剂接触。在一个实施方案中,与第二萃取剂的接触可发生在与第一萃取剂的接触相同的容器中。在一个实施方案中,与第二萃取剂的接触可发生在与第一萃取剂的接触不同的容器中。例如,第一萃取剂可以在一个容器中与发酵培养基接触,然后内容物被转移至另一个容器,在后者中发生与第二萃取剂的接触。在这些实施方案中,可将渗透物加入发酵培养基、第一萃取剂、任选的第二萃取剂、或它们的组合。

[0228] 所述有机萃取剂可以在发酵开始的时候与所述发酵培养基接触,从而形成双相发酵培养基。作为另外一种选择,所述有机萃取剂可以在当所述微生物达到期望的生长量之后与所述发酵培养基接触,其中所述生长量的达到可以通过测定培养物的光密度而确定。在一个实施方案中,所述第一萃取剂可在一个容器中与发酵培养基接触,并且所述第二萃取剂可以在同一容器中与发酵培养基和第一萃取剂接触。在另一个实施方案中,所述第二萃取剂可以在与第一萃取剂与发酵培养基在其中相接触的容器不同的容器中,与发酵培养基和第一萃取剂接触。在这些实施方案中,可将渗透物加入发酵培养基、第一萃取剂、任选的第二萃取剂、或它们的组合。

[0229] 此外,所述有机萃取剂可以在当发酵培养基中的丁醇水平达到预先确定的水平时

与发酵培养基接触,例如在丁醇浓度达到有毒或抑制水平之前。所述丁醇浓度可以利用本领域已知的方法,例如通过气相色谱法或高效液相色谱法,在发酵期间加以监测。可在丁醇浓度达到毒性或抑制水平之前或之后将渗透物加入到发酵培养基中。在多个实施方案中,有机萃取剂包含脂肪酸。在多个实施方案中,本文所述方法可与美国临时专利申请 61/368429 和 61/379546 所述方法联合使用,其中丁醇用有机酸如脂肪酸的酯化以形成丁醇酯,该过程使用催化剂如脂肪酶。

[0230] 发酵可以在有氧条件下进行足以使培养物达到预先选定的生长水平的时间,如通过测量光密度确定生长水平。可在达到预选的生长水平之前或之后将渗透物加入到发酵液中。然后可加入诱导剂以在所述经修饰的微生物中诱导丁醇生物合成途径的表达,并将发酵条件转至微氧或厌氧条件,以刺激丁醇的生产,如未决的美国专利申请公布 12/478,389 的实施例 6 中所详述。所述萃取剂可于转至微氧或厌氧条件之后加入。可在转换到微氧或厌氧条件之前或之后加入渗透物。在一个实施方案中,所述第一萃取剂可以在发酵培养基和第一萃取剂与第二萃取剂接触之前与发酵培养基接触。例如,在分批发酵过程中,在使发酵培养基与第一和第二萃取剂接触之间可以允许经过一段适当的时间。在连续发酵过程中,发酵培养基与第一萃取剂的接触可发生在一个容器中,而该容器内容物与第二萃取剂的接触可发生在第二容器中。在这些实施方案中,可将渗透物加入到发酵培养基、第一萃取剂、任选的第二萃取剂、或它们的组合中。

[0231] 发酵培养基与有机萃取剂在渗透物的存在下接触后,丁醇产物分配至有机萃取剂,降低了在包含微生物的水相中的浓度,从而限制了生产丁醇的微生物在抑制性的丁醇产品中的暴露。所使用的有机萃取剂的体积依赖于多种因素,包括所述发酵培养基的体积、所述发酵罐的尺寸、丁醇产物在所述萃取剂中的分配系数、渗透物浓度、以及发酵模式的选择,如下所述。有机萃取剂的体积可以是发酵罐工作容积的约 3% 至约 60%。萃取剂对发酵培养基的比率是从约 1 : 20 至约 20 : 1 的体积 : 体积比,例如从约 1 : 15 至约 15 : 1,或从约 1 : 12 至约 12 : 1,或从约 1 : 10 至约 10 : 1,或从约 1 : 9 至约 9 : 1,或从约 1 : 8 至约 8 : 1。

[0232] 加入的渗透物的量取决于许多因素,包括加入的渗透物对丁醇生产微生物的生长特性的效应以及加入的渗透物对两相发酵中丁醇 K_p 的效应。加入渗透物的最适量也可取决于初始基础发酵培养基的组成和发酵培养基中可发酵碳源的浓度。过高的渗透物浓度虽然可能提高丁醇的 K_p 并减轻丁醇对微生物的毒害效应,但它自身可能对微生物产生抑制。在另一方面,浓度过低的渗透物不可能将丁醇的 K_p 提高到足以减轻丁醇对微生物抑制效应的地步。因此,需要通过实验找到平衡以确保加入过多渗透物到发酵培养基中的净效应引起丁醇生产速率和滴度的总体提高。

[0233] 在多个实施方案中,与不加入渗透物的 K_p 相比, K_p 提高了约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 100%、约 150%、或约 200%。在多个实施方案中, K_p 提高了至少约 2 倍、至少约 3 倍、至少约 4 倍、至少约 5 倍、或至少约 6 倍。在多个实施方案中,选择渗透物总浓度以提高 K_p ,提高的量保持微生物的生长速率为不加入渗透物的生长速率的至少约 25%、至少约 50%、至少约 80%、或至少约 90% 的水平。在多个实施方案中,与不加入渗透物的生产速率相比,发酵培养基中的渗透物总浓度足以将丁醇生产的有效速率提高至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至

少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 100%。在多个实施方案中,与不加入渗透物的有效产量相比,发酵培养基中的渗透物总浓度足以将丁醇的有效产量提高至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 100%。在多个实施方案中,与不加入渗透物的有效滴度相比,发酵培养基中的渗透物总浓度足以将丁醇的有效滴度提高至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或至少约 100%。

[0234] 在多个实施方案中,加入的渗透物量足以产生至少约 7g/L、至少约 10g/L、至少约 15g/L、至少约 20g/L、至少约 25g/L、至少约 30g/L、或至少约 40g/L 的有效滴度。在多个实施方案中,加入的渗透物量足以产生至少约 0.12、至少约 0.15、至少约 0.2、至少约 0.25、或至少约 0.3 的有效产量。在多个实施方案中,加入的渗透物量足以产生至少约 0.1g/L/h、至少约 0.15g/L/h、至少约 0.2g/L/h、至少约 0.3g/L/h、至少约 0.4g/L/h 或至少约 0.6g/L/h、或至少约 0.8g/L/h、或至少约 1g/L/h 或至少约 1.2g/L/h 的有效生产速率。在一些实施方案中,速率为约 1.3g/L/h。

[0235] 下一步任选地为利用本领域已知的方法,包括但不限于虹吸、滗析、离心、利用重力分离器以及膜辅助的相分裂,将所述含丁醇有机相与所述水相分离。丁醇从所述含丁醇有机相中的回收可以用本领域已知的方法进行,这些方法包括但不限于蒸馏、树脂吸附、通过分子筛分离以及全蒸发。具体而言,可以采用蒸馏从所述含丁醇有机相中回收丁醇。丁醇生产和 / 或回收方法可再利用渗透物。

[0236] 可通过本领域已知的方法从发酵培养基或两相混合物的水相中回收渗透物。例如,可通过蒸馏、反萃取、全蒸发、或其他方法浓缩水相或发酵培养基以获得浓缩的包含渗透物的含水混合物。任选地,渗透物可返回至发酵培养基并因此在发酵过程中再利用。任选地,可将得自发酵碳水化合物底物中的渗透物加入到发酵培养基中以提供至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数的渗透物浓度。

[0237] 可在与使用有机萃取剂并加入渗透物的同时采用汽提从发酵培养基中移除丁醇产物。汽提可以通过将气体,如空气、氮气或二氧化碳,通过所述发酵培养基,从而形成含丁醇气相。丁醇产物可以用本领域已知的方法,如利用冷却水装置或用溶剂洗涤所述气相,从所述含丁醇气相中得到回收。

[0238] 发酵过程完成之后存在于发酵培养基中的任何丁醇均可通过用新鲜的或循环利用的有机萃取剂持续萃取而得到回收。作为另外的选择,丁醇可以用本领域已知的方法,如蒸馏、共沸蒸馏、液-液萃取、吸附、汽提、膜蒸发以及全蒸发等等,从发酵培养基中得到回收。在其中发酵培养基不在过程中再利用的情况下,可加入附加的渗透物以进一步提高丁醇分配系数并改善丁醇回收效率。

[0239] 所述两相萃取发酵方法可于搅拌槽发酵罐中以连续模式进行。在这种模式中,所述发酵培养基和所述含丁醇有机萃取剂的混合物被从发酵罐中移除。通过本领域已知的方法,包括但不限于虹吸、滗析、离心、利用重力分离器以及膜辅助的相分裂等等,将此两相分离,如上所述。在分离后,可使其中的发酵培养基或渗透物返回至发酵罐或可用其中加入渗透物的新培养基置换。然后,对萃取剂进行处理以回收丁醇产物,如上所述。萃取剂接下来

可被放回发酵罐中回收利用,用于进一步萃取产物。作为另外一种选择,可持续地将新鲜的萃取剂加入至发酵罐中,以替换被移除的萃取剂。这种连续的运行模式具有若干优点。由于产物被不断地从反应器中移除,只需较小体积的有机萃取剂就能允许较大体积的发酵培养基的使用。结果带来较高的产品收率。有机萃取剂的体积可以为发酵罐工作容积的约 3% 至约 50%;为发酵罐工作容积的 3% 至约 20%;或为发酵罐工作容积的 3% 至约 10%。使用尽可能最小量的萃取剂以使所述水相的体积最大化,从而使所述发酵罐内细胞的量最大化,是有利的。所述过程可以完全连续的模式运行,在这种模式中,萃取剂在发酵罐和分离设备之间连续循环利用,而发酵培养基被连续地从所述发酵罐中移除并由新鲜的培养基补足。在这种完全连续的模式中,丁醇产物不被允许达到毒性临界浓度,并且新鲜的营养物质被连续地提供,因此发酵可以长时间进行。可用于进行这些模式的两相萃取发酵的设备为本领域所熟知。例如,实例由 Kollerup 等人描述于美国专利 4,865,973 中。

[0240] 也可以采用分批发酵模式。为本领域所熟知的分批发酵系封闭系统,其中发酵培养基的组成设定于发酵开始的时候,并且在发酵过程中不受人体的调整。在这种模式中,将期望量的渗透物和期望体积的有机萃取剂加入到发酵罐中并且在过程中不移除萃取剂。有机萃取剂可以通过分别地添加第一和任选的第二萃取剂而在发酵罐中形成,或者可以合并第一和第二萃取剂以形成萃取剂,然后再将任何萃取剂添加至发酵罐。可将渗透物加入发酵培养基、第一萃取剂、任选的第二萃取剂、或它们的组合。虽然这种发酵模式比上述连续的或者完全连续的模式更简单,但它需要更大体积的有机萃取剂,以使发酵培养基中抑制性的丁醇产物的浓度最小化。因此,发酵培养基的体积相对更少,所生产的产物的量也比采用上述连续模式时所获得的更少。在分批模式中,有机萃取剂的体积可以为发酵罐工作容积的约 20% 至约 60%;或者为发酵罐工作容积的 30% 至约 60%。基于上文所述原因,在发酵罐中使用尽可能最小体积的萃取剂是有利的。

[0241] 还可采用分批补料发酵模式。分批补料发酵是标准的分批系统的变型,在这种模式中,营养物质如葡萄糖在发酵期间被分批加入。营养物质加入的量和速率可通过常规实验确定。例如,可以在发酵期间监测发酵培养基中关键营养物质的浓度。作为另外的选择,可以对更易测量的因素,如 pH、溶解氧以及废气(如二氧化碳)的分压加以监测。从这些测量参数可以确定营养物质添加的速率。在这种模式中使用的有机萃取剂的量及其添加方法与在分批模式中所使用的相同,如上文所述。加入的渗透物量可与其他发酵模式中的量相同。

[0242] 产物的萃取可以在发酵罐的下游,而不是在原位进行。在这种外部模式中,丁醇产物向所述有机萃取剂中的萃取,系采用已自发酵罐中移除的发酵培养基进行。可将渗透物加入到从发酵罐中移除的发酵培养基中。所使用的萃取剂的量为发酵罐工作容积的约 20% 至约 60%;或者为发酵罐工作容积的 30% 至约 60%。所述发酵培养基可以连续地或者间歇地从发酵罐中移除,并且用所述有机萃取剂对丁醇产物进行的萃取可以在从发酵培养基中去除或者不去除细胞的情况下进行。细胞可以通过本领域已知的方法从发酵培养基中去除,所述方法包括但不限于过滤或离心。可在移除细胞之前或之后将渗透物添加到发酵培养基中。在用上述方法将发酵培养基与萃取剂分离之后,所述发酵培养基可放入发酵罐中回收利用,或者被丢弃,或者处理以移除任何残余的丁醇产物。类似地,分离的细胞也可放入发酵罐中回收利用。在进行回收丁醇产物的处理之后,萃取剂可被回收利用于萃取过程

中。作为另外一种选择,也可以使用新鲜的萃取剂。在这种模式中,萃取剂不存在于发酵罐中,因此萃取剂的毒性远不是问题。如果在使发酵培养基与萃取剂接触之前即将细胞从所述发酵培养基中分离,则可进一步减小萃取剂毒性的问题。此外,采用这种外部模式时,形成乳液的可能性更小,并且萃取剂的蒸发被最小化,减轻了环境问题。

[0243] 使用具有加入渗透物的萃取发酵生产丁醇的方法

[0244] 提供了生产丁醇的改善方法,其中经基因修饰的微生物经由生物合成途径从至少一种可发酵碳源中生产丁醇,所述微生物在双相发酵培养基中生长,其包含水相和 i) 第一与水不混溶的有机萃取剂和任选的 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,并且所述双相发酵培养基还包含至少一种渗透物,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。此类经基因修饰的微生物可选自细菌、蓝细菌、丝状真菌和酵母,并且包括例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。第一与水不混溶的有机萃取剂可选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺、以及它们的混合物,并且所述任选的第二与水不混溶的有机萃取剂可选自 C_7 - C_{22} 醇、 C_7 - C_{22} 羧酸、 C_7 - C_{22} 羧酸的酯、 C_7 - C_{22} 醛、 C_7 - C_{22} 酰胺以及它们的混合物,其中双相发酵培养基包含按体积计约 10% 至约 90% 的有机萃取剂。作为另外一种选择,双相发酵培养基可包含按体积计约 3% 至约 60%, 或约 15% 至约 50% 的有机萃取剂。所述微生物在所述双相发酵培养基中生长一段时间,其足以使丁醇被萃取至所述萃取剂以形成含丁醇有机相。发酵培养基中至少足够的渗透物浓度可通过在微生物生长期将渗透物加入到水相中、在丁醇生产期内将渗透物加入到水相中、当水相中的丁醇浓度导致抑制时将渗透物加入到水相中、将渗透物加入到第一萃取剂中、加入到第二萃取剂中、或加入到它们的组合中来达到。

[0245] 在一个实施方案中,所述发酵培养基还包含乙醇,并且所述含丁醇有机相可包含乙醇。然后,将所述含丁醇有机相与所述水相分离,如上文所述。随后,从所述含丁醇有机相中回收丁醇,如上文所述。

[0246] 还提供了生产丁醇的方法,其中经基因修饰以通过生物合成途径从至少一种碳源生产丁醇的微生物在发酵培养基中生长,所述微生物在其中向发酵培养基中生产丁醇以产生含丁醇的发酵培养基。此类经基因修饰的微生物可选自细菌、蓝细菌、丝状真菌和酵母,并且包括例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。将至少一种渗透物加入到所述发酵培养基中以提供至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数的渗透物浓度。在一个实施方案中,当微生物生长期减缓时可将渗透物加入到发酵培养基中。在一个实施方案中,当丁醇生产期结束时,可将渗透物添加到发酵培养基中。至少一部分含丁醇的发酵培养基与第一与水不混溶的有机萃取剂接触,所述有机萃取剂选自 C_{12} - C_{22} 脂肪醇、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸、 C_{12} - C_{22} 脂肪酸的酯、 C_{12} - C_{22} 脂肪醛、 C_{12} - C_{22} 脂肪酰胺以及它们的混合物,和任选地 ii) 第二与水不混溶的有机萃取剂,所述有机萃取剂选自 C_7 - C_{22} 醇、 C_7 - C_{22} 羧酸、 C_7 - C_{22} 羧酸的酯、 C_7 - C_{22} 醛、 C_7 - C_{22} 酰胺、以及它们的混合物,以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。然后将所述含丁醇有机相与所述水相分离,如上文所述。随后,从所述含丁醇有机相回收丁醇,如上文所述。至少一部分所述水相被返回至发

醇培养基。在一个实施方案中,所述发酵培养基还包含乙醇,并且所述含丁醇有机相可包含乙醇。

[0247] 利用经修饰的大肠杆菌菌株结合使用油醇作为有机萃取剂,可以通过萃取发酵生产异丁醇,如美国专利申请 12/478,389 中所公开的。与使用常规的发酵技术相比,该方法产生更高的异丁醇有效滴度(即 37g/L), (参见美国专利申请 12/478,389 的实施例 6)。例如,Atsumi 等人 (Nature 451(3):86-90,2008) 报导了用经过基因修饰从而包含异丁醇生物合成途径的大肠杆菌进行发酵时,最高 22g/L 的异丁醇滴度。用美国专利申请 12/478,389 所公开的萃取发酵方法获得的较高的丁醇滴度,至少部分地是由于有毒的丁醇产物从发酵培养基中的移除,从而保持了其水平低于对微生物有毒的水平。以下假定是合理的:本发明的萃取发酵方法使用至少一种渗透物,所述渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任意的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数,所述方法将以相似的方式使用并提供相似的结果。

[0248] 用本文所公开的方法生产的丁醇可具有大于 22g 每升发酵培养基的有效滴度。作为另外一种选择,用本文所公开的方法生产的丁醇可具有至少 25g 每升发酵培养基的有效滴度。作为另外一种选择,用本文所公开的方法生产的丁醇可具有至少 30g 每升发酵培养基的有效滴度。作为另外一种选择,用本文所公开的方法生产的丁醇可具有至少 37g 每升发酵培养基的有效滴度。

[0249] 本发明的方法一般如下文所述,参见图 1 至图 7。

[0250] 现在参见图 1,显示的是采用原位萃取发酵生产和回收丁醇的过程的一个实施方案的示意图。至少一种可发酵碳源的水流 10 任选地包含渗透物,将其导入包含至少一种经基因修饰的微生物(未示出)的发酵罐 20,所述微生物从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇。任选地,可将渗透物以独立流(未示出)形式加入到发酵罐中。将第一萃取剂的流 12 和任选的第二萃取剂的流 14 引入容器 16,其中混合所述第一和第二萃取剂以形成混合萃取剂 18。任选地,可将渗透物加入到(未示出)流 18 中、加入到容器 16 中、加入到第一萃取剂流 12 中、加入到第二萃取剂流 14 中、或加入到它们的组合中。上述萃取剂 18 的流被引入发酵罐 20,发酵培养基在其中与萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。同时包含上述水相和有机相的流 26 被引入容器 38,在该容器中,进行上述水相和有机相的分离,从而产生含丁醇有机相 40 和水相 42。任选地,使至少一部分包含渗透物的水相 42 返回至(未示出)发酵罐 20 或另一个发酵罐(未示出)中。选择渗透物加入所述过程的加入点使得水相 42 中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任意的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。

[0251] 现在参见图 2,显示的是采用原位萃取发酵生产和回收丁醇的过程的一个实施方案的示意图。至少一种可发酵碳源的水流 10 任选地包含渗透物,将其导入包含至少一种经基因修饰的微生物(未示出)的发酵罐 20,所述微生物从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇。任选地,可将渗透物以独立流(未示出)形式加入到发酵罐中。组成萃取剂的第一萃取剂的流 12 和任选的第二萃取剂的流 14 被分别引入发酵罐 20,在该发酵罐中,发生发酵培养基与萃取剂的接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。任选地,可将渗透物加入到(未示出)流 12 中、加入到流 14 中、或加入到它们的组合中。同时包含上述水相和有机相的流 26 被引入容器 38,在该容器中,进行上述水相和有机相的分

离,从而产生含丁醇有机相 40 和水相 42。任选地,使至少一部分包含渗透物的水相 42 返回至(未示出)发酵罐 20 或另一个发酵罐(未示出)中。选择渗透物加入所述过程的加入点使得水相 42 中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。

[0252] 现在参见图 3,显示的是采用原位萃取发酵生产和回收丁醇的过程的一个实施方案的示意图。至少一种可发酵碳源的水流 10 任选地包含渗透物,将其导入包含至少一种经基因修饰的微生物(未示出)的第一发酵罐 20,所述微生物从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇。任选地,可将渗透物以独立流(未示出)形式加入到发酵罐中。所述第一萃取剂的流 12 被引入上述发酵罐 20,并且包含由第一萃取剂和发酵罐 20 的内容物组成的混合物的流 22 被引入第二发酵罐 24。所述任选的第二萃取剂的流 14 被引入上述第二发酵罐 24,其中发酵培养基与萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。任选地,可将渗透物加入到(未示出)流 12 中、加入到流 22 中、加入到流 14 中、加入到容器 24 中、或加入到它们的组合中。同时包含上述水相和有机相的流 26 被引入容器 38,在该容器中,进行上述水相和有机相的分离,从而产生含丁醇有机相 40 和水相 42。任选地,使至少一部分包含渗透物的水相 42 返回至(未示出)发酵罐 20 或另一个发酵罐(未示出)中。选择渗透物加入所述过程的加入点使得水相 42 中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。

[0253] 现在参见图 4,显示的是生产和回收丁醇的过程的一个实施方案的示意图,其中对产物的萃取在发酵罐的下游,而不是在原位进行。至少一种可发酵碳源的水流 110 任选地包含渗透物,将其导入包含至少一种经基因修饰的微生物(未示出)的发酵罐 120,所述微生物从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇。任选地,可将渗透物以独立流(未示出)形式加入到发酵罐中。将第一萃取剂的流 112 和任选的第二萃取剂的流 114 引入容器 116,其中混合所述第一和第二萃取剂以形成混合萃取剂 118。发酵罐 120 中的至少一部分发酵培养基,显示为流 122,被引入容器 124。任选地,可将渗透物加入到(未示出)流 112 中、加入到流 114 中、加入到容器 116 中、加入到流 118 中、加入到容器 124 中、或加入到它们的组合中。上述萃取剂的流 118 也被引入容器 124,发酵培养基在其中与萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。同时包含上述水相和有机相的流 126 被引入容器 138,在该容器中,进行上述水相和有机相的分离,从而产生含丁醇有机相 140 和水相 142。任选地,使至少一部分包含渗透物的水相 142 返回至发酵罐 120 或另一个发酵罐(未示出)中。选择渗透物加入所述过程的加入点使得水相 142 中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。

[0254] 现在参见图 5,显示的是生产和回收丁醇的过程的一个实施方案的示意图,其中对产物的萃取在发酵罐的下游,而不是在原位进行。至少一种可发酵碳源的水流 110 任选地包含渗透物,将其导入包含至少一种经基因修饰的微生物(未示出)的发酵罐 120,所述微生物从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇。任选地,可将渗透物以独立流(未示出)形式加入到发酵罐中。将第一萃取剂的流 112 和第二萃取剂的流 114 分别引入容器 124,其中混合所述第一和第二萃取剂以形成混合萃取剂。任选地,可将渗透物加入到

(未示出)流 112 中、加入到流 114 中、加入到流 122 中、加入到容器 124 中、或加入到它们的组合中。发酵罐 120 中的至少一部分发酵培养基,显示为流 122,也被引入容器 124,上述发酵培养基和萃取剂在其中接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。同时包含上述水相和有机相的流 126 被引入容器 138,在该容器中,进行上述水相和有机相的分离,从而产生含丁醇有机相 140 和水相 142。任选地,使至少一部分包含渗透物的水相 142 返回至发酵罐 120 或另一个发酵罐(未示出)中。选择渗透物加入所述过程的加入点使得水相 142 中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。

[0255] 现在参见图 6,显示的是生产和回收丁醇的过程的一个实施方案的示意图,其中对产物的萃取在发酵罐的下游,而不是在原位进行。至少一种可发酵碳源的水流 110 任选地包含渗透物,将其导入包含至少一种经基因修饰的微生物(未示出)的发酵罐 120,所述微生物从包含至少一种可发酵碳源的发酵培养基中生产丁醇。任选地,可将渗透物以独立流(未示出)形式加入到发酵罐中。所述第一萃取剂的流 112 被引入容器 128,并且发酵罐 120 中的至少一部分发酵培养基,显示为流 122,也被引入容器 128。任选地,可将渗透物加入到(未示出)流 122 中、加入到流 112 中、加入到容器 128 中、或加入到它们的组合中。包含由上述第一萃取剂和发酵罐 120 的内容物组成的混合物的流 130 被引入第二容器 132。任选地,可将渗透物加入到(未示出)流 130 中、加入到流 114 中、加入到容器 132 中、或加入到它们的组合中。所述任选的第二萃取剂的流 114 被引入上述第二容器 132,其中发酵培养基与萃取剂接触以形成包含水相和含丁醇有机相的两相混合物。同时包含上述水相和有机相的流 134 被引入容器 138,在该容器中,进行上述水相和有机相的分离,从而产生含丁醇有机相 140 和水相 142。任选地,使至少一部分包含渗透物的水相 142 返回至发酵罐 120 或另一个发酵罐(未示出)中。选择渗透物加入所述过程的加入点使得水相 142 中的渗透物浓度至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和如本文所定义的任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数。

[0256] 本文所述的萃取过程可以作为分批过程运行,或者可以连续模式运行,其中新鲜的萃取剂被加入而使用过的萃取剂被泵出,使得发酵罐中的萃取剂的量在整个发酵过程中保持不变。如此对发酵培养基中产物和副产物的连续萃取能提高有效速率、有效滴度和有效产量。

[0257] 在另一个实施方案中,还可以在柔性顺流中,或者作为另外一种选择,以逆流方式进行液-液萃取,其中当使用一系列分批发酵罐时,所述逆流方式是导致分批操作模式的差异的原因。在这种方案中,只要设备在运行,提供了至少一种可发酵碳源和微生物的发酵醪液就会以连续方式一个接一个地充满发酵罐。参见图 7,一旦发酵罐 F100 被醪液和微生物填满,所述醪液和微生物就进一步填入发酵罐 F101,继而填入发酵罐 F102,然后回到发酵罐 F100 形成连续循环。可将渗透物加入到(未示出)一个或多个发酵罐、加入到进入发酵罐的流中、加入到流出发酵罐的流中、或加入到它们的组合中。在任何一个发酵罐中,一旦醪液和微生物同时存在,发酵即开始,并持续至发酵完全。醪液和微生物的充填时间等于发酵罐的数量除以总的循环时间(填充,发酵,排空和清洗)。若总的循环时间为 60 小时且有 3 个发酵罐,则充填时间为 20 小时。若总的循环时间为 60 小时且有 4 个发酵罐,则充填时间为 15 小时。

[0258] 适合的顺流萃取所根据的发酵模式假定,以较高的肉汤相滴度运行的发酵罐能够利用丁醇浓度最高的萃取溶剂,而以最低的肉汤相滴度运行的发酵罐能受益于丁醇浓度最低的萃取溶剂流。例如,再次参见图 7,考虑此种情况,即发酵罐 F100 位于发酵的起始并以相对低的丁醇肉汤相 (B) 滴度运行,发酵罐 F101 位于发酵的中部并以相对中等的丁醇肉汤相滴度运行,并且发酵罐 F102 靠近发酵的末端并以相对高的丁醇肉汤相滴度运行。这种情况下,不含或仅含极少的萃取的丁醇的贫萃取溶剂 (S),可被供给发酵罐 F100,来自发酵罐 F100 的含有萃取的丁醇组分的“流出溶剂”(S') 可作为“流入溶剂”被供给发酵罐 F101,而来自 F101 的流出溶剂可继而作为流入溶剂供给发酵罐 F102。然后,来自 F102 的流出溶剂可接受处理以回收该溶剂流中存在的丁醇。绝大多数丁醇已被移除的经过处理的溶剂流,可作为贫萃取溶剂返回至系统中,并作为供给上述发酵罐 F100 的流入溶剂。

[0259] 随着发酵以有序方式进行,可重置萃取溶剂多歧管的阀门,以将最贫的萃取溶剂供给以最低的丁醇肉汤相滴度运行的发酵罐。例如,假定 (a) 发酵罐 F102 完成了其发酵过程,已被重新装料并重新开始发酵,(b) 发酵罐 F100 处于其发酵过程的中期,正以中等的丁醇肉汤相滴度运行,以及 (c) 发酵罐 F101 接近其发酵过程的末期,正以相对较高的丁醇肉汤相滴度运行。在这种情形中,最贫的萃取溶剂将会供给 F102,自 F102 流出的萃取溶剂将会供给发酵罐 F100,而自发酵罐 F100 流出的萃取溶剂将会供给发酵罐 F101。

[0260] 以这种方式运行的好处在于可在尽量长的时间里保持肉汤相丁醇滴度尽可能地低,从而实现生产率的提升。此外,在已进一步进入以较高的丁醇肉汤相滴度运行的发酵过程的其他发酵罐中,是有可能降低温度的。温度的降低能允许对较高丁醇肉汤相滴度的耐受力的提升。

[0261] 本发明的方法的优点

[0262] 本发明的萃取发酵法提供丁醇,已知其具有与汽油相似的能含量,并能与任何化石燃料混合。丁醇是优选的燃料或燃料添加剂,因为它在标准内燃机中燃烧时仅生成 CO_2 并且几乎不产生或根本不产生 SO_x 或 NO_x 。另外,丁醇的腐蚀性不及乙醇,是目前为止最优选的燃料添加剂。

[0263] 除了用作生物燃料或燃料添加剂之外,根据本发明的方法所生产的丁醇还具有冲击燃料电池工业中的氢分配问题的潜在可能。如今,由于氢的运输和分配存在安全隐患,燃料电池饱受困扰。可容易地对丁醇重整其氢含量,并且可通过现有的加油站以燃料电池或汽车所需的纯度进行分配。此外,本发明的方法从植物来源的碳源生产丁醇,避免了标准的石油化学的丁醇生产工艺所涉及的对环境的负面影响。

[0264] 本发明方法的优点包括在比通过两相萃取发酵方法获得的异丁醇含量阈值显著更高并且更经济的净有效速率、滴度和产量下生产丁醇的可行性,所述两相萃取发酵方法加入的至少一种渗透物未达到至少足以提高相对于在基础发酵培养基的渗透物浓度和任选的可发酵碳源的存在下的丁醇分配系数的渗透物浓度。本发明方法也能够减少达到分配发酵中期望丁醇产量水平所需的新鲜或再利用萃取剂的净用量。

实施例

[0265] 本发明将在以下的实施例中进一步阐述。应当理解,尽管这些实施例说明了本发明的优选的实施方案,但它们仅是以例证的方式给出的。通过上述论述和这些实施例,本领域

域的技术人员可确定本发明的本质特征,并且在不脱离本发明的实质和范围的前提下,可对本发明进行各种变化和修改以使其适应多种用途和条件。

[0266] 材料

[0267] 以下材料用于实施例中。所有商购试剂均按原样使用。

[0268] 所有溶剂均从 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 获得,并在未经进一步纯化的情况下被使用。所使用的油醇为工业级,其包含油醇 (65%) 以及高级和低级脂肪醇的混合物。异丁醇 (纯度 99.5%) 得自 Sigma-Aldrich 并使用时无需进一步纯化。

[0269] 一般方法

[0270] 水相中的异丁醇和葡萄糖浓度使用带有适当保护柱的 7.8mm×300mm BioRad Aminex HPX-87H 柱 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA), 用 0.01N 硫酸水溶液作为洗脱剂等强度洗脱,通过 HPLC (Waters Alliance Model, Milford, MA 或 Agilent 1200 系列, Santa Clara, CA) 测量。样品经过 0.2 μm 离心过滤器 (Nanosep MF 改性尼龙) 进入 HPLC 样品瓶。HPLC 运行条件如下:

[0271] 注射体积: 10 μL

[0272] 流量: 0.60 mL/分钟

[0273] 运行时间: 40 分钟

[0274] 柱温: 40 °C

[0275] 检测器: 折射率

[0276] 检测器温度: 35 °C

[0277] UV 检测: 210nm, 8nm 带宽

[0278] 运行结束后,根据标准曲线来测定每个化合物在样本中的浓度。异丁醇和葡萄糖的保留时间分别为 32.6 分钟和 9.1 分钟。

[0279] 实施例 1

[0280] 蔗糖浓度对分配系数 (K_p) 的效应

[0281] 该实施例的目的在于评估当使用油醇作为萃取剂时,发酵培养基中的蔗糖浓度对异丁醇分配系数 (K_p) 的效应。通常在大肠杆菌发酵中使用的基础发酵培养基 (BFM) 在该实施例中用作发酵培养基。表 2 示出了 BFM 组成。

[0282] 表 2: BFM 组成

[0283]

组分	浓度 (g/L) 或如文所示	浓度 (毫摩尔 /L ;mM)
磷酸二氢钾	13.3	97.73
磷酸氢二铵	4.0	30.28
一水合柠檬酸	1.7	8.09
七水合硫酸镁	2.0	8.11
微量元素 (mL/L)	10.0	--

盐酸硫胺素 (mg/L)	4.5	--
酵母提取物	5.0	--
Sigma 消泡剂 204 (mL/L)	0.20	--
葡萄糖	30.0	170

[0284] 如下制备在上述培养基中使用的微量元素溶液。以列出的顺序加入下文列出的成分并将溶液加热到 50℃ -60℃ 直至所有成分完全溶解。在其他成分溶于溶液后缓慢加入柠檬酸铁。使用 0.2 微米过滤器将溶液过滤除菌。

[0285]

EDTA (乙二胺四乙酸)	0.84g/L
六水合氯化钴 (6 水氯化钴)	0.25g/L
四水合氯化锰 (4 水氯化锰)	1.5g/L
二水合氯化铜	0.15g/L
硼酸 (H_3BO_3)	0.30g/L
二水合钼酸钠	0.25g/L
二水合乙酸锌	1.30g/L
柠檬酸铁	10.0g/L

[0286] 如表 2 所示的 BFM 中的初始盐总含量 (磷酸二氢钾、磷酸氢二铵、一水合柠檬酸和七水合硫酸镁的总量) 经计算为约 144.2mM。将 2 毫摩尔 /L 的盐酸甜菜碱加入到基础培养基中, 因为它是文献中熟知的 (Cosquer A 等人; 1999; Appl Environ Microbiol 65: 3304-3311) 用于改善大肠杆菌高渗耐受性的物质。

[0287] 使用以下实验方法生成表 3 中的数据。在这些 K_p 测量实验中, 加入指定量的蔗糖作为基础发酵培养基的渗透物。将包含 168g/L 异丁醇的 10mL 富含异丁醇的油醇 (OA) 萃取剂加入到 30mL 补充蔗糖的 BFM 中并在 30℃ 下, 在台式振荡器 (Innova 4230, New Brunswick scientific, Edison, NJ) 中以 250rpm 振荡速率剧烈混合 4 和 8 小时以达到两相间的平衡。通过离心分离了每个烧瓶中的水相和有机相。离心水相 (2 分钟, 13,000rpm, 使用 Eppendorf 5415R 型离心机) 以移出残余萃取剂相, 并且通过 HPLC 对上清液进行了葡萄糖和异丁醇的分析。在振荡 4 小时后分析水相中的异丁醇含量, 结果类似于在混合 8 小时后获得的含量, 表明在 4 小时内达到了两相之间的平衡。目的是为了证明 4 小时之外的进一步混合不改变 K_p 。

[0288] 关于异丁醇在有机相和水相之间分布的分配系数 (K_p), 是从加入烧瓶的已知量的异丁醇和对水相测得的异丁醇浓度数据计算得出。萃取剂相中的异丁醇浓度通过质量平衡确定。分配系数被定为有机相和水相中异丁醇浓度的比率, 即 $K_p = [\text{异丁醇}]_{\text{有机相}} / [\text{异丁醇}]_{\text{水相}}$ 。如表 3 所示对应于指定含量蔗糖的每个数据点重复两次, 并且将 K_p 值报告为两个烧瓶的均值。

[0289] 表 3: 蔗糖浓度对异丁醇 K_p 的效应

[0290]

BFM 中的糖 (葡萄糖) 初始 总浓度 (表 2) 摩尔/L (a)	加入到 BFM 中的蔗糖量 蔗糖 (摩尔/L) (b)	实验中的糖总量 摩尔/L (a) + (b)	K _p
0.17	0	0.17	4.35
0.17	0.03	0.20	4.44
0.17	0.09	0.26	4.41
0.17	0.17	0.34	4.60
0.17	0.26	0.43	4.69
0.17	0.33	0.50	5.09
0.17	0.51	0.68	5.21
0.17	0.67	0.84	5.85
0.17	1.00	1.17	6.85
0.17	1.33	1.50	7.77
0.17	2.00	2.17	10.69

[0291] 表 3 中的结果表明给含水的发酵培养基补充蔗糖形式的渗透物在以油醇作为萃取剂相的两相系统中产生较高的异丁醇 K_p。

[0292] 实施例 2 (预见)

[0293] 通过在发酵培养基中加入过量葡萄糖或蔗糖作为渗透物提高异丁醇产量

[0294] 在典型发酵培养基中培养能够生产异丁醇的经基因修饰的细菌或酵母,所述培养基由一些作为氮源的低含量盐和磷酸盐、维生素、微量元素、酵母提取物蛋白胨和碳源如葡萄糖或蔗糖组成。碳源的浓度通常在 2g/L 至 30g/L 之间。为了促进生物质产生,发酵的初始阶段为有氧阶段,其中将空气以 0.2-1.0 体积-体积每分钟 (vvm) 注入培养基中。温度保持在 30℃, pH 保持在 5.0 和 6.5 之间。一旦生长出足量的生物质,将发酵转换为厌氧条件或微氧条件以启动异丁醇的生产。厌氧条件通过完全切断空气供应形成,而微氧条件通过减缓空气供应和 / 或减少搅拌速度形成。在此发酵生产阶段,异丁醇在培养基中积聚并且浓度一直升高直至它变成对微生物抑制性的,这导致发酵速率减缓。净效应是较低的异丁醇生产总体速率和滴度。

[0295] 在生产期将有机萃取剂如油醇加入到发酵罐中从水相中萃取丁醇,这减轻它对微生物的抑制效应,导致较高的异丁醇发酵速率和滴度。一旦异丁醇的水相浓度达到抑制阈值级别,在这个两相系统中的发酵速率也减缓。在发酵罐中萃取剂 (油醇) 的存在下,异丁醇在水中的浓度由异丁醇在两相间的分配系数 (K_p) 决定。在油醇 / 水系统中, K_p 在 3.5-4.5 的范围内。如果在发酵期间异丁醇的 K_p 能增加到使得异丁醇水相浓度下降到低于抑制阈值级别的水平,可获得显著提高的异丁醇生产速率和滴度。

[0296] 实施例 1 的结果表明加入高水平的蔗糖能够显著地提高 K_p,因此一旦实施例 2 中的异丁醇水相浓度在发酵期间达到抑制水平,通常加入高水平 (50-250g/L) 的至少一种渗透物如葡萄糖、蔗糖、玉米醪、或它们的组合以减轻异丁醇对微生物的抑制效应。净效应将是较高的总体异丁醇发酵速率和滴度。此外,由于加入此类渗透物导致的 K_p 提高将导致与其中不加入作为渗透物的过量糖到发酵培养基中的情况相比,在 ISPR 期间改善的和高效的萃取过程。

[0297] 在一个实施方案中,可在发酵期间通过控制玉米醪中的淀粉水解成葡萄糖的速

率来调节和改变葡萄糖形式的渗透物浓度。玉米醪主要包含淀粉（葡萄糖聚合物），其在玉米-乙醇工业中通常用作碳源以生产乙醇。在这种方法中，首先在高温（85℃-100℃）下通过加入热稳定的 α -淀粉酶（例如 SPEZYME®FRED-L；Genencor International, San Francisco, USA）将玉米醪液化 90-120 分钟，然后将液化的玉米醪加入到包含合适微生物（生物催化剂）的发酵罐中以如本发明所述生产或者乙醇或者丁醇。在发酵期间缓慢释放液化玉米醪中的葡萄糖并通过加入第二种酶例如葡糖淀粉酶（Distillase®L-400；Genencor International, San Francisco, USA）到发酵罐中使其可被微生物利用。通常控制发酵罐中葡萄糖利用速率的淀粉水解速率通过发酵期间加入的葡糖淀粉酶量进行操纵。在这个预见的丁醇生产实施例中，建议一旦两相发酵罐的水相中的丁醇达到抑制水平，能够通过加入过量葡糖淀粉酶将渗透物葡萄糖的含量提高到非常高的水平以最大化丁醇的 K_p 。这种在丁醇发酵期间调节葡萄糖含量的方法使得人们能够最优地递送渗透物到生长期和发酵生产期中。

[0298] 下文描述了在预见实施例 2 中能使用的分析方法。

[0299] 培养液中的葡萄糖浓度可使用 2700Select Biochemistry 分析仪 (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH) 快速测量。培养液样品将在 1.8mL 的 Eppendorf 管中以 13,200rpm 于室温离心 2 分钟，并且对含水的上清液分析葡萄糖浓度。在检测每组发酵罐样品之前，分析仪可用已知的葡萄糖标准品进行了自我校准；也可周期性地检测了外部标准品以保证培养液检测的完整性。用于所述分析的分析仪的技术参数如下：

[0300] 样品大小：15 μ L

[0301] 黑色探头化学品：右旋糖

[0302] 白色探头化学品：右旋糖

[0303] 能够使用如下所述的气相色谱法 (GC) 测量有机萃取剂相中的异丁醇和乙醇。

[0304] 能够使用以下 GC 方法测定有机相中异丁醇和乙醇的量。GC 方法将利用购自 Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 的 J&W Scientific DB-WAXETR 柱 (50m $\times$ 0.32mm 内径, 1 μ m 膜)。载气为氦气，其流量为恒定顶压下 4mL/min；喷射器分流为 1 : 5, 250℃；加热炉温度为 40℃, 5min, 以 10℃/min 从 40℃升温至 230℃, 并且 230℃, 5 分钟。火焰离子化检测器将在 250℃、40mL/min 的氦气补气条件下使用。将培养液样品将在注射前离心。注射体积为 1.0 μ L。校准过的标准曲线从乙醇和异丁醇中产生。在这些条件下，异丁醇保留时间为 9.9 分钟，乙醇的保留时间为 8.7 分钟。

[0305] 尽管在前述中描述了本发明的特定实施方案，但本领域的技术人员将会理解，在不脱离本发明的精神或必要属性的情况下能够作出许多修改、替代和重新排列。应参考指明本发明范围的所附权利要求书而不是上述说明书。

[0001]

序列表

- <110> Butamax (TM) Advanced Biofuels
 <120> 使用添加电解质的萃取发酵生产丁醇的方法
 <130> CL4728
 <150> US 61/263,522
 <151> 2009-11-23
 <160> 95
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 1680
 <212> DNA
 <213> 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)

```

<400> 1
atggacaaac agtatccggt acgccagtgg ggcacggcg ccgatctcgt cgtcagtcag      60
ctggaagctc agggagtagc ccaggtgttc ggcatccccg ggcctaaaat cgacaaggtc      120
tttgattcac tgctggattc ctccattcgc attattccgg tacgccacga agccaacgcc      180
gcatttatgg ccgccgccgt cggacgcatt accggcaaag cgggcgtggc gctggtcacc      240
tcgggtccgg gctgttccaa cctgateacc ggcatggcca ccgcgaacag cgaaggcgac      300
ccgggtggtg ccctgggcgg cgcggtaaaa cgcgccgata aagcgaagca ggtccaccag      360
agtatggata cgggtggcgt gttcagcccg gtcaccaaata acgccatcga ggtgacggcg      420
ccggatgcgc tggcgggaagt ggtctccaac gccttcgcgc ccgccgagca gggccggccg      480
ggcagcgcgt tcgttagcct gccgcaggat gtgggtcgat gcccggtcag cggcaaagtg      540
ctgccggcca ggggggcccc gcagatgggc gccgcgccgg atgatgcat cgaccagggtg      600
ggaagctta tcgccaggc gaagaaccgc atcttctgc tcggcctgat ggccagccag      660
ccggaaaaca gcaaggcgct gcgccgtttg ctggagacca gccatattcc agtcaccagc      720
acctatcagg ccgccggagc ggtgaatcag gataacttct ctcgttcgc cggccggggtt      780
gggctgttta acaaccaggc cggggaccgt ctgctgcagc tcgccacct ggtgatctgc      840
atcggttaca gcccggtgga atacgaaccg gcgatgtgga acagcggcaa cgcgacgctg      900
gtgcacatcg acgtgtgcc gcctatgaa gagcgcaact acaccccgga tgtcgagctg      960
gtgggcgata tcgccggcac tctcaacaag ctggcgcaaa atatcgatca tcggttggtg     1020
ctctccccgc aggcggcgga gatcctcgc gaccgccagc accagcgcga gctgctggac     1080
cgcccgggcg cgcagctcaa ccagtttgcc ctgcateccc tgcgcacgt tcgcgccatg     1140
caggatatcg tcaacagcga cgtcacgttg accgtggaca tgggcagctt ccatatctgg     1200
attgcccgtt acctgtacac gttccgcgcc cgtcagggtg tgatctccaa cggccagcag     1260
accatgggcg tcgccctgcc ctgggctatc ggccgctggc tgggtcaatc tgagcgcaaa     1320
gtggtctcgc tctccggcga cggcggttct ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgcc     1380

```

[0002]

gtccgcctga aagccaacgt gctgcatctt atctgggtcg ataacggcta caacatggtc 1440
 gctatccagg aagagaaaaa atatcagcgc ctgtccggcg tcgagtttgg gccgatggat 1500
 tttaaagcct atgccgaatc cttcggcgcg aaagggtttg ccgtggaaag cgccgaggcg 1560
 ctggagccga ccctgcgcgc ggcgatggac gtcgacggcc cggcggtagt ggccatcccg 1620
 gtggattatc gcgataaccc gctgctgatg ggccagctgc atctgagtca gattctgtaa 1680

<210> 2
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)

<400> 2

Met Asp Lys Gln Tyr Pro Val Arg Gln Trp Ala His Gly Ala Asp Leu
 1 5 10 15

Val Val Ser Gln Leu Glu Ala Gln Gly Val Arg Gln Val Phe Gly Ile
 20 25 30

Pro Gly Ala Lys Ile Asp Lys Val Phe Asp Ser Leu Leu Asp Ser Ser
 35 40 45

Ile Arg Ile Ile Pro Val Arg His Glu Ala Asn Ala Ala Phe Met Ala
 50 55 60

Ala Ala Val Gly Arg Ile Thr Gly Lys Ala Gly Val Ala Leu Val Thr
 65 70 75 80

Ser Gly Pro Gly Cys Ser Asn Leu Ile Thr Gly Met Ala Thr Ala Asn
 85 90 95

Ser Glu Gly Asp Pro Val Val Ala Leu Gly Gly Ala Val Lys Arg Ala
 100 105 110

Asp Lys Ala Lys Gln Val His Gln Ser Met Asp Thr Val Ala Met Phe
 115 120 125

Ser Pro Val Thr Lys Tyr Ala Ile Glu Val Thr Ala Pro Asp Ala Leu
 130 135 140

Ala Glu Val Val Ser Asn Ala Phe Arg Ala Ala Glu Gln Gly Arg Pro
 145 150 155 160

Gly Ser Ala Phe Val Ser Leu Pro Gln Asp Val Val Asp Gly Pro Val
 165 170 175

Ser Gly Lys Val Leu Pro Ala Ser Gly Ala Pro Gln Met Gly Ala Ala
 180 185 190

[0003]

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

[0004]

450	455	460	
Ala Asn Val Leu His Leu Ile Trp Val Asp Asn Gly Tyr Asn Met Val 465 470 475 480			
Ala Ile Gln Glu Glu Lys Lys Tyr Gln Arg Leu Ser Gly Val Glu Phe 485 490 495			
Gly Pro Met Asp Phe Lys Ala Tyr Ala Glu Ser Phe Gly Ala Lys Gly 500 505 510			
Phe Ala Val Glu Ser Ala Glu Ala Leu Glu Pro Thr Leu Arg Ala Ala 515 520 525			
Met Asp Val Asp Gly Pro Ala Val Val Ala Ile Pro Val Asp Tyr Arg 530 535 540			
Asp Asn Pro Leu Leu Met Gly Gln Leu His Leu Ser Gln Ile Leu 545 550 555			
<210> 3			
<211> 1476			
<212> DNA			
<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)			
<400> 3			
atggctaact acttcaatac actgaatctg cgccagcagc tggcacagct gggcaaatgt		60	
cgcttttatgg gccgcgatga attcgccgat ggccgcagct accttcaggg taaaaaagta		120	
gtcatcgctcg gctgtggcgc acagggctctg aaccagggcc tgaacatgcg tgattctggt		180	
ctcgatatct cctacgctct gcgtaaagaa gcgattgccg agaagcgcgc gtccctggcgt		240	
aaagcgaccg aaaatgggtt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcggat		300	
ctgggtgatta acctgacgcc ggacaagcag cactctgatg tagtgcgcac cgtacagcca		360	
ctgatgaaag acggcgcggc gctgggctac tcgcacggtt tcaacatcgt cgaagtgggc		420	
gagcagatcc gtaaagatat caccgtagtg atggttgccg cgaaatgccc aggcaccgaa		480	
gtgcgtgaag agtacaaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattgccgt tcacccgaa		540	
aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcggctgc aaccgggtgt		600	
caccgtgcgg gtgtgctgga atcgctcttc gttgcggaag tgaaatctga cctgatgggc		660	
gagcaaacca tcctgtgcgg tatgttgacg gctggctctc tgctgtgctt cgacaagctg		720	
gtggaagaag gtaccgatcc agcatacgca gaaaaactga ttcagttcgg ttgggaacc		780	
atcaccgaag cactgaaaca gggcggcatc accctgatga tggaccgtct ctctaaccgc		840	
gcgaaactgc gtgcttatgc gctttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc		900	
cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattctctt ccggtatgat ggcggactgg		960	
gccaacgatg ataagaaaact gtgacctgg cgtgaagaga ccggcaaac cgcgtttgaa		1020	

[0005]

```

accgcgccgc agtatgaagg caaaatcggc gagcaggagt acttcgataa aggcgtactg      1080
atgattgcga tggtgaaagc gggcggtgaa ctggcgttcg aaaccatggg cgattccggc      1140
atcattgaag agtctgcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaacacc      1200
atgcccgcga agcgtctgta cgaaatgaac gtgggttatct ctgataccgc tgagtacggg      1260
aactatctgt tctcttacgc ttgtgtgccg ttgctgaaac cgtttatggc agagctgcaa      1320
ccgggcgacc tgggtaaagc tattccggaa ggccgggtag ataacgggca actgcgtgat      1380
gtgaacgaag cgattcgcag ccatgcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcggctat      1440
atgacagata tgaaacgtat tgctgttgcg ggttaa                                1476

```

<210> 4
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 4

```

Met Ala Asn Tyr Phe Asn Thr Leu Asn Leu Arg Gln Gln Leu Ala Gln
1              5              10              15

```

```

Leu Gly Lys Cys Arg Phe Met Gly Arg Asp Glu Phe Ala Asp Gly Ala
20              25              30

```

```

Ser Tyr Leu Gln Gly Lys Lys Val Val Ile Val Gly Cys Gly Ala Gln
35              40              45

```

```

Gly Leu Asn Gln Gly Leu Asn Met Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Ser
50              55              60

```

```

Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ile Ala Glu Lys Arg Ala Ser Trp Arg
65              70              75              80

```

```

Lys Ala Thr Glu Asn Gly Phe Lys Val Gly Thr Tyr Glu Glu Leu Ile
85              90              95

```

```

Pro Gln Ala Asp Leu Val Ile Asn Leu Thr Pro Asp Lys Gln His Ser
100             105             110

```

```

Asp Val Val Arg Thr Val Gln Pro Leu Met Lys Asp Gly Ala Ala Leu
115             120             125

```

```

Gly Tyr Ser His Gly Phe Asn Ile Val Glu Val Gly Glu Gln Ile Arg
130             135             140

```

```

Lys Asp Ile Thr Val Val Met Val Ala Pro Lys Cys Pro Gly Thr Glu
145             150             155             160

```

```

Val Arg Glu Glu Tyr Lys Arg Gly Phe Gly Val Pro Thr Leu Ile Ala

```

[0006]

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

[0007]

Lys Pro Phe Met Ala Glu Leu Gln Pro Gly Asp Leu Gly Lys Ala Ile
435 440 445

Pro Glu Gly Ala Val Asp Asn Gly Gln Leu Arg Asp Val Asn Glu Ala
450 455 460

Ile Arg Ser His Ala Ile Glu Gln Val Gly Lys Lys Leu Arg Gly Tyr
465 470 475 480

Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Ala Val Ala Gly
485 490

<210> 5
<211> 1851
<212> DNA
<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 5
atgcctaagt accgttccgc caccaccact catggtcgta atatggcggg tgctcgtgcg 60
ctgtggcgcg ccaccggaat gaccgacgcc gatttcggta agccgattat cgcggttggtg 120
aactcgttca cccaatttgt accgggtcac gtccatctgc gcgatctcgg taaactggtc 180
gccgaacaaa ttgaagcggc tggcggcgtt gccaaagagt tcaacacat tgcggtggat 240
gatgggattg ccatgggcca cgggggggatg ctttattcac tgccatctcg cgaactgac 300
gctgattccg ttgagtatat ggtcaacgcc cactgcgcgc acgccatggt ctgcactctt 360
aactgcgaca aaatcacccc ggggatgctg atggcttccc tgcgcctgaa tattccggtg 420
atctttgttt cggcggcgcc gatggaggcc gggaaaacca aactttccga tcagatcatc 480
aagctcgatc tggttgatgc gatgatccag ggccgcagacc cgaaagtatc tgactccag 540
agegatcagg ttgaacgttc cgcgtgtccg acctgcgggt cctgctccgg gatgtttacc 600
gctaactcaa tgaactgcct gaccgaagcg ctgggcctgt cgcagccggg caacggctcg 660
ctgctggcaa ccacgcgca cagtaagcag ctgttcccta atgctggtaa acgcattggt 720
gaattgacca aacgttatta cgagcaaac gacgaaagt cactgccgcg taatatcgcc 780
agtaaggcgg cgtttgaana cgccatgacg ctggatatcg cgatgggtgg atcgactaac 840
accgtacttc acctgctggc ggccggcgag gaagcggaaa tcgacttcac catgagtgat 900
atcgataagc tttcccga ggttccacag ctgtgtaaag ttgcgcgag caccagaaa 960
taccatatgg aagatgttca ccgtgctggt ggtgttatcg gtattctcgg cgaactggat 1020
cgccgggggt tactgaaccg tgatgtgaaa aacgtacttg gcctgacgtt gccgcaaac 1080
ctggaacaat acgacgttat gctgacctag gatgacggg taaaaaatat gtcccgcca 1140
ggtcctgcag gcattcgtac cacacaggca ttctcgcaag attgccgttg ggatacgtg 1200
gacgacgac gcgccaatgg ctgtatccgc tcgctggaac acgcctacag caaagacggc 1260
ggcctggcgg tgctctacgg taactttgcg gaaaacggct gcacgtgaa aacggcaggc 1320

[0008]

```

gtcgatgaca gcatectcaa attcaccggc cggcgaaag tgtacgaaag ccaggacgat      1380
gcggtagaag cgattctcgg cggtaaagtt gtcgccggag atgtggtagt aattcgctat      1440
gaaggccccga aaggcgggtcc ggggatgcag gaaatgtctt acccaaccag cttcctgaaa      1500
tcaatgggtc tcggcaaagc ctgtgcgctg atcaccgacg gtcgtttctc tgggtggcacc      1560
tctggtcttt ccatcgcca cgtctcaccg gaagcggcaa gcggcggcag cattggcctg      1620
attgaagatg gtgacctgat cgctatcgac atcccgaacc gtggcattca gttacaggta      1680
agcgatgccg aactggcggc gcgtcgtgaa gcgcaggacg ctcgagggtga caaagcctgg      1740
acgccgaaaa atcgtgaacg tcaggtctcc tttgccctgc gtgcttatgc cagcctggca      1800
accagcgccg acaaaggcgc ggtgcgcgat aaatcgaaac tgggggggta a              1851

```

<210> 6
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 6

Met Pro Lys Tyr Arg Ser Ala Thr Thr Thr His Gly Arg Asn Met Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Met Thr Asp Ala Asp Phe
 20 25 30

Gly Lys Pro Ile Ile Ala Val Val Asn Ser Phe Thr Gln Phe Val Pro
 35 40 45

Gly His Val His Leu Arg Asp Leu Gly Lys Leu Val Ala Glu Gln Ile
 50 55 60

Glu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Glu Phe Asn Thr Ile Ala Val Asp
 65 70 75 80

Asp Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Arg Glu Leu Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Cys
 100 105 110

Ala Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly
 115 120 125

Met Leu Met Ala Ser Leu Arg Leu Asn Ile Pro Val Ile Phe Val Ser
 130 135 140

Gly Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Thr Lys Leu Ser Asp Gln Ile Ile
 145 150 155 160

[0009]

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

[0010]

420	425	430
Gly Cys Ile Val Lys Thr Ala Gly Val Asp Asp Ser Ile Leu Lys Phe 435 440 445		
Thr Gly Pro Ala Lys Val Tyr Glu Ser Gln Asp Asp Ala Val Glu Ala 450 455 460		
Ile Leu Gly Gly Lys Val Val Ala Gly Asp Val Val Val Ile Arg Tyr 465 470 475 480		
Glu Gly Pro Lys Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu Tyr Pro Thr 485 490 495		
Ser Phe Leu Lys Ser Met Gly Leu Gly Lys Ala Cys Ala Leu Ile Thr 500 505 510		
Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser Ile Gly His Val 515 520 525		
Ser Pro Glu Ala Ala Ser Gly Gly Ser Ile Gly Leu Ile Glu Asp Gly 530 535 540		
Asp Leu Ile Ala Ile Asp Ile Pro Asn Arg Gly Ile Gln Leu Gln Val 545 550 555 560		
Ser Asp Ala Glu Leu Ala Ala Arg Arg Glu Ala Gln Asp Ala Arg Gly 565 570 575		
Asp Lys Ala Trp Thr Pro Lys Asn Arg Glu Arg Gln Val Ser Phe Ala 580 585 590		
Leu Arg Ala Tyr Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val 595 600 605		
Arg Asp Lys Ser Lys Leu Gly Gly 610 615		

<210> 7
 <211> 1647
 <212> DNA
 <213> 乳酸乳球菌 (Lactococcus lactis)

<400> 7
 atgtatactg tgggggatta cctgctggat cgcctgcacg aactggggat tgaagaaatt 60
 ttcggtgtgc caggcgatta taacctgcag ttcctggacc agattatctc gcacaaagat 120
 atgaagtggg tcggtaacgc caacgaactg aacgcgagct atatggcaga tggttatgcc 180
 cgtacacaaa aagctgctgc gtttctgacg acctttggcg ttggcgaact gagcgccgtc 240
 aacggactgg caggaagcta cgccgagaac ctgccagttg tcgaaattgt tgggtgcct 300

[0011]

```

acttctaagg ttcagaatga aggcaaattt gtgcaccata ctctggtga tggggatttt 360
aaacatttta tgaaaatgca tgaacegggt actgcggccc gcacgctgct gacagcagag 420
aatgctacgg ttgagatcga ccgctcctg tctgcgtgc tgaaagagcg caagccggtg 480
tatatcaatc tgcctgtcga tgttgccgca gcgaaagccg aaaagccgtc gctgccactg 540
aaaaaagaaa acagcacctc caatacatcg gaccaggaaa ttctgaataa aatccaggaa 600
tcaactgaaga atgcgaagaa accgatcgtc atcaccggac atgagatcat ctcttttggc 660
ctggaaaaaa cggtcacgca gttcatttct aagaccaaac tgcctatcac caccctgaac 720
ttcgcaaat ctagectcga tgaagcgtg ccgagtttct tgggtatcta taatggtacc 780
ctgtccgaac cgaacctgaa agaattcgtc gaaagcggg actttatcct gatgctgggc 840
gtgaaactga cggatagctc cacaggcgca tttaccacc atctgaacga gaataaaatg 900
atttcctga atatcgacga aggcaaaatc tttacgagc gcatccagaa cttegatttt 960
gaatctctga ttagttcgtc gctggatctg tccgaaattg agtataaagg taaatatatt 1020
gataaaaaac aggaggattt tgtgccgtct aatgcgtgc tgagtcagga tcgtctgtgg 1080
caagccgtag aaaacctgac acagtctaata gaaacgattg ttgcggaaca gggaacttca 1140
tttttcggcg cctcatccat ttttctgaaa tccaaaagcc atttcattgg ccaaccgtg 1200
tgggggagta ttggttatac ctttcggcg gcgctgggtt cacagattgc agataaggaa 1260
tcacgccatc tgcgttttat tggtgacggc agcctgcagc tgactgtcca ggaactgggg 1320
ctggcgatcc gtgaaaaaat caatccgatt tgctttatca tcaataacga cggctacacc 1380
gtcgaacgcg aaattcatgg accgaatcaa agttacaatg acatcccgat gtggaactat 1440
agcaaaactgc cggaatcctt tggcgcgaca gaggatcgcg tggtagtaa aattgtgcgt 1500
acggaaaacg aatttgtgtc ggttatgaaa gaagcgcagg ctgacccgaa tcgcatgtat 1560
tggattgaac tgatcctggc aaaagaagcg gcaccgaaag ttctgaaaaa gatggggaaa 1620
ctgtttgcgg agcaaaataa aagctaa 1647

```

<210> 8

<211> 548

<212> PRT

<213> 乳酸乳球菌 (Lactococcus lactis)

<400> 8

```

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1           5           10          15

```

```

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20          25          30

```

```

Asp Gln Ile Ile Ser His Lys Asp Met Lys Trp Val Gly Asn Ala Asn
35          40          45

```

[0012]

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

[0013]

305	310	315	320
Glu Ser Leu Ile	Ser Ser Leu Leu Asp	Leu Ser Glu Ile	Glu Tyr Lys
	325	330	335
Gly Lys Tyr Ile	Asp Lys Lys Gln	Glu Asp Phe Val	Pro Ser Asn Ala
	340	345	350
Leu Leu Ser	Gln Asp Arg Leu	Trp Gln Ala Val	Glu Asn Leu Thr Gln
	355	360	365
Ser Asn Glu Thr	Ile Val Ala Glu	Gln Gly Thr Ser	Phe Phe Gly Ala
	370	375	380
Ser Ser Ile Phe	Leu Lys Ser Lys	Ser His Phe Ile	Gly Gln Pro Leu
	385	390	395
Trp Gly Ser Ile	Gly Tyr Thr Phe	Pro Ala Ala Leu	Gly Ser Gln Ile
	405	410	415
Ala Asp Lys Glu	Ser Arg His Leu	Leu Phe Ile Gly	Asp Gly Ser Leu
	420	425	430
Gln Leu Thr Val	Gln Glu Leu Gly	Leu Ala Ile Arg	Glu Lys Ile Asn
	435	440	445
Pro Ile Cys Phe	Ile Ile Asn Asn	Asp Gly Tyr Thr	Val Glu Arg Glu
	450	455	460
Ile His Gly Pro	Asn Gln Ser Tyr	Asn Asp Ile Pro	Met Trp Asn Tyr
	465	470	475
Ser Lys Leu Pro	Glu Ser Phe Gly	Ala Thr Glu Asp	Arg Val Val Ser
	485	490	495
Lys Ile Val Arg	Thr Glu Asn Glu	Phe Val Ser Val	Met Lys Glu Ala
	500	505	510
Gln Ala Asp Pro	Asn Arg Met Tyr	Trp Ile Glu Leu	Ile Leu Ala Lys
	515	520	525
Glu Gly Ala Pro	Lys Val Leu Lys	Lys Met Gly Lys	Leu Phe Ala Glu
	530	535	540
Gln Asn Lys Ser			
545			
<210>	9		
<211>	1047		
<212>	DNA		

[0014]

<213> 木糖氧化无色杆菌 (*Achromobacter xyloxi*dans)

<400> 9

```

atgaaagctc tggtttatca cggtgaccac aagatctcgc ttgaagacaa gccaagccc      60
acccttcaaa agcccacgga tgtagtagta cgggttttga agaccacgat ctgcggcacg      120
gatctcggca tctacaaagg caagaatcca gaggtcgcgc acgggcgcac cctgggccat      180
gaaggggtag gcgtcatcga ggaagtgggc gagagtgtca cgcagttcaa gaaaggcgac      240
aaggctctga ttctctgcgt cacttcttgc ggctcgtgcg actactgcaa gaagcagctt      300
tactcccatt gccgcgacgg cgggtggatc ctgggttaca tgatcgatgg cgtgcaggcc      360
gaatacgtcc gcateccgca tgccgacaac agcctctaca agatccccc gacaattgac      420
gacgaaatcg ccgtctgct gagcgacatc ctgcccaccg gccacgaaat cggcgtccag      480
tatgggaatg tccagccggg cgatgcggtg gctattgtcg gcgcgggccc cgtcggcatg      540
tcgctactgt tgaccgccc gttctactcc ccctcgacca tcctcgtgat cgacatggac      600
gagaatcgcc tccagctcgc caaggagctc ggggcaacgc acaccatcaa ctccggcacg      660
gagaacgttg tcgaagccgt gcataggatt gcggcagagg gattcgatgt tgcgatcgag      720
gcggtgggca taccggcgac ttgggacatc tgccaggaga tcgtcaagcc cggcgcgcac      780
atcgccaacg tcggcgtgca tggcgtcaag gttgacttcg agattcagaa gctctggatc      840
aagaacctga cgatcaccac gggactgggtg aacacgaaca cgacgcccac gctgatgaag      900
gtgcctcga ccgacaagct tccgttgaag aagatgatta cccatcgctt cgagctggcc      960
gagatcgagc acgcctatca ggtattcttc aatggcgcca aggagaaggc gatgaagatc     1020
atcctctcga acgcaggcgc tgcttga                                     1047

```

<210> 10

<211> 348

<212> PRT

<213> 木糖氧化无色杆菌 (*Achromobacter xyloxi*dans)

<400> 10

```

Met Lys Ala Leu Val Tyr His Gly Asp His Lys Ile Ser Leu Glu Asp
1              5              10              15

```

```

Lys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Lys Pro Thr Asp Val Val Val Arg Val
20              25              30

```

```

Leu Lys Thr Thr Ile Cys Gly Thr Asp Leu Gly Ile Tyr Lys Gly Lys
35              40              45

```

```

Asn Pro Glu Val Ala Asp Gly Arg Ile Leu Gly His Glu Gly Val Gly
50              55              60

```

```

Val Ile Glu Glu Val Gly Glu Ser Val Thr Gln Phe Lys Lys Gly Asp
65              70              75              80

```

[0015]

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

[0016]

340	345
<210> 11 <211> 1713 <212> DNA <213> 枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	
<400> 11	
ttgacaaaag caacaaaaga acaaaaatcc cttgtgaaaa acagaggggc ggagcttggt	60
gttgattgct tagtgagca aggtgtcaca catgtatttg gcattccagg tgcaaaaatt	120
gatgcggtat ttgacgcttt acaagataaa ggacctgaaa ttatcgttgc ccggcacgaa	180
caaaacgcag cattcatggc ccaagcagtc ggccgtttaa ctggaaaacc gggagtcgtg	240
ttagtacat caggaccggg tgcctctaac ttggcaacag gcctgctgac agcgaacact	300
gaaggagacc ctgtcgttgc gcttgctgga aacgtgatcc gtgcagatcg tttaaaacgg	360
acacatcaat ctttgataa tgcggcgcta ttccagccga ttacaaaata cagtgtagaa	420
gttcaagatg taaaaaatat accggaagct gttacaaatg catttaggat agcgtcagca	480
gggcaggctg gggccgcttt tgtgagcttt ccgcaagatg ttgtgaatga agtcacaaat	540
acgaaaaacg tgcgtgctgt tgcagegcca aaactcggtc ctgcagcaga tgatgcaatc	600
agtgcggcca tagcaaaaat ccaaacagca aaacttcctg tcgttttggt cggcattgaaa	660
ggcggaagac cggaagcaat taaagcgggt cgcaagcttt tgaaaaaggt tcagcttcca	720
tttgttgaaa catatcaage tgcgggtacc ctttctagag atttagagga tcaatatttt	780
ggcgtatcg gtttgttcg caaccagcct ggcgatttac tgctagagca ggcagatggt	840
gttctgacga tcggtatga cccgattgaa tatgatccga aattctggaa tatcaatgga	900
gaccggacaa ttatccattt agacgagatt atcgctgaca ttgatcatgc ttaccagcct	960
gatcttgaat tgatcgggtga cattccgtcc acgatcaatc atatcgaaca cgatgctgtg	1020
aaagtggaaat ttgcagagcg tgagcagaaa atcctttctg atttaaaaca atatatgcat	1080
gaaggtgagc aggtgcctgc agattggaaa tcagacagag cgcacctctt tgaaatcggt	1140
aaagagttgc gtaatgcagt cgatgatcat gttacagtaa ctltcgatat cggttcgcac	1200
gccatttgga tgtcacgtta ttccgcagc tacgagccgt taacattaat gatcagtaac	1260
ggtatgcaaa cactcggcgt tgcgttcct tgggcaatcg gcgcttcatt ggtgaaaccg	1320
ggagaaaaag tggtttctgt ctctggtgac ggcggtttct tattctcagc aatggaatta	1380
gagacagcag ttcgactaaa agcaccaatt glacacattg tatggaacga cagcacatat	1440
gacatggttg cattccagca attgaaaaaa tataaccgta catctgcggt cgatttcgga	1500
aatatcgata tcgtgaaata tgcggaaagc ttcggagcaa ctggcttgcg cgtagaatca	1560
ccagaccage tggeagatgt tctgcgtcaa ggcatgaacg ctgaaggtec tgtcatcatc	1620
gatgtcccggt ttgaclacag tgataacatt aatttagcaa gtgacaagct tccgaaagaa	1680
ttcggggaac tcatgaaaac gaaagctctc tag	1713

[0017]

<210> 12
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

 <400> 12

 Met Thr Lys Ala Thr Lys Glu Gln Lys Ser Leu Val Lys Asn Arg Gly
 1 5 10 15

 Ala Glu Leu Val Val Asp Cys Leu Val Glu Gln Gly Val Thr His Val
 20 25 30

 Phe Gly Ile Pro Gly Ala Lys Ile Asp Ala Val Phe Asp Ala Leu Gln
 35 40 45

 Asp Lys Gly Pro Glu Ile Ile Val Ala Arg His Glu Gln Asn Ala Ala
 50 55 60

 Phe Met Ala Gln Ala Val Gly Arg Leu Thr Gly Lys Pro Gly Val Val
 65 70 75 80

 Leu Val Thr Ser Gly Pro Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Leu Leu
 85 90 95

 Thr Ala Asn Thr Glu Gly Asp Pro Val Val Ala Leu Ala Gly Asn Val
 100 105 110

 Ile Arg Ala Asp Arg Leu Lys Arg Thr His Gln Ser Leu Asp Asn Ala
 115 120 125

 Ala Leu Phe Gln Pro Ile Thr Lys Tyr Ser Val Glu Val Gln Asp Val
 130 135 140

 Lys Asn Ile Pro Glu Ala Val Thr Asn Ala Phe Arg Ile Ala Ser Ala
 145 150 155 160

 Gly Gln Ala Gly Ala Ala Phe Val Ser Phe Pro Gln Asp Val Val Asn
 165 170 175

 Glu Val Thr Asn Thr Lys Asn Val Arg Ala Val Ala Ala Pro Lys Leu
 180 185 190

 Gly Pro Ala Ala Asp Asp Ala Ile Ser Ala Ala Ile Ala Lys Ile Gln
 195 200 205

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

 Glu Ala Ile Lys Ala Val Arg Lys Leu Leu Lys Lys Val Gln Leu Pro

[0018]

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

[0019]

Val Asp Phe Gly Asn Ile Asp Ile Val Lys Tyr Ala Glu Ser Phe Gly
500 505 510

Ala Thr Gly Leu Arg Val Glu Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Val Leu
515 520 525

Arg Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Pro Val Ile Ile Asp Val Pro Val
530 535 540

Asp Tyr Ser Asp Asn Ile Asn Leu Ala Ser Asp Lys Leu Pro Lys Glu
545 550 555 560

Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu
565 570

<210> 13
<211> 1188
<212> DNA
<213> 啤酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 13
atgttgagaa ctcaagccgc cagattgata tgcaactccc gtgtcatcac tgctaagaga 60
acctttgctt tggccaccgc tgctgtgtgt tacagcagac cagctgcccc tttcgttaag 120
ccaatgatca ctaccgctgg tttgaagcaa atcaacttcg gtggtactgt tgaaaccgtc 180
tacgaaagag ctgactggcc aagagaaaag ttgttggact acttcaagaa cgacactttt 240
gctttgatcg gttacgggtc ccaagggttac ggtcaagggt tgaacttgag agacaacggg 300
ttgaacgtta tcattggtgt ccgtaaagat ggtgcttctt ggaaggctgc catcgaagac 360
ggttgggttc caggcaagaa ctgttctact gttgaagatg ctatcaagag aggtagttag 420
gttatgaact tgtgtgccga tgccgctcaa tcagaaacct ggcctgctat caagccattg 480
ttgaccaagg gtaagacttt gtactttctc cacggtttct cccagtcctt caaggacttg 540
actcacgttg aaccaccaa ggacttagat gttatcttgg ttgctccaaa gggttccggg 600
agaactgtca gatctttggt caaggaaggc cgtggtatta actcttctta cgcctcttgg 660
aacgatgtca ccggttaaggc tcacgaaaag gcccaagctt tggccgttgc cattggttcc 720
ggttacgttt accaaaccac tttcgaaaaga gaagtcaact ctgacttgta cggtgaaaga 780
ggttggttaa tgggtggtat ccacggtatg ttcttggtc aatacgacgt cttgagagaa 840
aacggtcact cccatctga agctttcaac gaaaccgtcg aagaagctac ccaatctcta 900
taccattga tcggttaagta cggtatggat tacatgtacg atgcttggtc caccaccgcc 960
agaagagggt ctttggactg gtacccaatc ttcaagaatg ctttgaagcc tgttttccaa 1020
gacttgtagc aatctaccaa gaacggtacc gaaaccaaga gatctttgga attcaactct 1080
caacctgact acagagaaaa gctagaaaag gaattagaca ccatcagaaa catggaaatc 1140
tggaagggtg gtaaggaagt cagaaagttg agaccagaaa accaataa 1188

[0020]

<210> 14
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> 啤酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

 <400> 14

 Met Leu Arg Thr Gln Ala Ala Arg Leu Ile Cys Asn Ser Arg Val Ile
 1 5 10 15

 Thr Ala Lys Arg Thr Phe Ala Leu Ala Thr Arg Ala Ala Tyr Ser
 20 25 30

 Arg Pro Ala Ala Arg Phe Val Lys Pro Met Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 35 40 45

 Lys Gln Ile Asn Phe Gly Gly Thr Val Glu Thr Val Tyr Glu Arg Ala
 50 55 60

 Asp Trp Pro Arg Glu Lys Leu Leu Asp Tyr Phe Lys Asn Asp Thr Phe
 65 70 75 80

 Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Gly Leu Asn Leu
 85 90 95

 Arg Asp Asn Gly Leu Asn Val Ile Ile Gly Val Arg Lys Asp Gly Ala
 100 105 110

 Ser Trp Lys Ala Ala Ile Glu Asp Gly Trp Val Pro Gly Lys Asn Leu
 115 120 125

 Phe Thr Val Glu Asp Ala Ile Lys Arg Gly Ser Tyr Val Met Asn Leu
 130 135 140

 Leu Ser Asp Ala Ala Gln Ser Glu Thr Trp Pro Ala Ile Lys Pro Leu
 145 150 155 160

 Leu Thr Lys Gly Lys Thr Leu Tyr Phe Ser His Gly Phe Ser Pro Val
 165 170 175

 Phe Lys Asp Leu Thr His Val Glu Pro Pro Lys Asp Leu Asp Val Ile
 180 185 190

 Leu Val Ala Pro Lys Gly Ser Gly Arg Thr Val Arg Ser Leu Phe Lys
 195 200 205

 Glu Gly Arg Gly Ile Asn Ser Ser Tyr Ala Val Trp Asn Asp Val Thr
 210 215 220

 Gly Lys Ala His Glu Lys Ala Gln Ala Leu Ala Val Ala Ile Gly Ser

[0021]

225	230	235	240
Gly Tyr Val Tyr	Gln Thr Thr Phe Glu	Arg Glu Val Asn Ser	Asp Leu
	245	250	255
Tyr Gly Glu Arg	Gly Cys Leu Met	Gly Gly Ile His	Gly Met Phe Leu
	260	265	270
Ala Gln Tyr Asp	Val Leu Arg Glu	Asn Gly His Ser	Pro Ser Glu Ala
	275	280	285
Phe Asn Glu Thr	Val Glu Glu Ala Thr	Gln Ser Leu Tyr	Pro Leu Ile
	290	295	300
Gly Lys Tyr Gly	Met Asp Tyr Met	Tyr Asp Ala Cys	Ser Thr Thr Ala
305	310	315	320
Arg Arg Gly Ala	Leu Asp Trp Tyr	Pro Ile Phe Lys	Asn Ala Leu Lys
	325	330	335
Pro Val Phe Gln	Asp Leu Tyr Glu	Ser Thr Lys Asn	Gly Thr Glu Thr
	340	345	350
Lys Arg Ser Leu	Glu Phe Asn Ser	Gln Pro Asp Tyr	Arg Glu Lys Leu
	355	360	365
Glu Lys Glu Leu	Asp Thr Ile Arg	Asn Met Glu Ile	Trp Lys Val Gly
	370	375	380
Lys Glu Val Arg	Lys Leu Arg Pro	Glu Asn Gln	
385	390	395	

<210> 15

<211> 1014

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 荧光假单胞菌 (Pseudomonas fluorescens) ilvC编码区突变体

<400> 15

atgaaggtgt ttacgataa agactgcgat ctgagcatca tccagggaag gaaggttgc 60

attataggat atggttccca aggacacgca caagccttga acttgaaaga ttctggggtc 120

gacgtgacag taggtctgta taaaggtgct gctgatgcag caaaggctga agcacatggc 180

tttaaagtca cagatgttgc agcggctgtt gctggcgctg atttagtcat gattttaatt 240

ccagatgaat ttcaatcgca attgtacaaa aatgaaatag aaccaaacat taagaagggc 300

gctacettgg ccttcagtca tggatttgcc attcattaca atcaagtagt ccccagggca 360

gatttggacg ttattatgat tgcacctaag gctccggggc atactgttag gagcgaattt 420

[0022]

```

gttaagggtg gtggtattcc agatttgatc gctatatacc aagacgttag cggaacgct      480
aagaatgtag ctttaagcta cgcagcagga gttggtggcg ggagaacggg tataatagaa      540
accactttta aagacgagac tgagacagat ttatttggag aacaagcggg tctgtgcgga      600
ggaactgttg aattggttaa agcaggettt gagacgcttg tcgaagcagg gtacgctccc      660
gaaatggcat acttcgaatg tctacatgaa ttgaagtga tagtagactt aatgtatgaa      720
ggtggtatag ctaatatgaa ctattccatt tcaaataatg cagaatatgg tgagtatgtc      780
accggacctg aagtcattaa cgcagaatca agacaagcca tgagaaatgc cttgaaacgt      840
atccaggacg gtgaatacgc taagatgttc ataagtgaag gcgctacggg ttacccgagt      900
atgactgcta aaagaagaaa caatgcagca catggtatcg aaattattgg tgaacagtta      960
aggtctatga tgccctggat cgggtgctaata aagatcgtag acaaggcgaa aaat      1014

```

<210> 16

<211> 338

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 蛋白突变体

<400> 16

```

Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
1           5           10          15

```

```

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
          20          25          30

```

```

Leu Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Tyr Lys
          35          40          45

```

```

Gly Ala Ala Asp Ala Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr
50          55          60

```

```

Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Ile
65          70          75          80

```

```

Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn
          85          90          95

```

```

Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His
100          105          110

```

```

Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala
115          120          125

```

```

Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly
130          135          140

```

[0023]

Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala
145 150 155 160

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Val Gly Gly Gly Arg Thr
165 170 175

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe
180 185 190

Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala
195 200 205

Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr
210 215 220

Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu
225 230 235 240

Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr
245 250 255

Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln
260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys
275 280 285

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys
290 295 300

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu
305 310 315 320

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala
325 330 335

Lys Asn

<210> 17

<211> 1713

<212> DNA

<213> 变异链球菌 (Streptococcus mutans)

<400> 17

atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta gttctgttta cgattcaatg 60

gttaaatacac ctaatcgtgc tatgttgcgt gcaactggta tgcaagatga agactttgaa 120

aaacctatcg tcgggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta 180

catgactttg gtaaactagc caaagtcggt gttaaggaag ctgggtccttg gccagttcag 240

[0024]

```

ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa cccaaggaat gcgtttctcc 300
ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg 360
gatgcttttg tagccattgg cggttgtgat aaaaacatgc cggttctgt tatcgtatg 420
gctaacatgg atatcccagc cttttttgct tacggcggaa caattgcacc tggtaattta 480
gacggcaaag atatcgattt agtctctgtc tttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc 540
gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg cttgtcccgg tectggaggc 600
tgcgggtggtg tgtatactgc taacacaatg gcgacagcta ttgaagtttt gggacttagc 660
cttcggggtt catctttctca cccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa 720
gttggtcgcg ctgttgtaaa aatgctcgaa atgggcttaa aaccttctga cattttaacg 780
cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggagggtc aaccaactca 840
acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtg aattgacact tgatgatttc 900
aatactttcc aagaaaaagt tectcatttg gctgatttga aaccttctgg tcaatatgta 960
ttccaagacc ttacaaggt cggaggggta ccagcagta tgaaatatct ccttaaaaat 1020
ggcttccttc atggtgaccg taccattgt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag 1080
gcttttgatg atttaacacc tggtaaaaag gttattatgc cgcttgaaaa tctaaacgt 1140
gaagatggtc cgtcattat tctccatggt aacttggtc cagacgggtc cgttgcaaaa 1200
gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggctctgta aggtctttaa ttctgaagaa 1260
gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg gtgatgtgtg tgcgtacgt 1320
ttttaggac caaagggeg tcttggtatg cctgaaatgc tttcccttc atcaatgatt 1380
gttggtaaag ggcaagggtg aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctcagggtgt 1440
acttatggtc ttgctgtggg tcatatgct cctgaagcac aagatggcgg tccaatgcgc 1500
tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca ctaaggaatt acactttgat 1560
atctccgatg aagagttaaa acatcgtaaa gagaccattg aattgccacc gctctattca 1620
cgcggtatcc ttggtaaata tgetcacatc gtttcgtctg cttctagggg agccgtaaca 1680
gacttttggg agcctgaaga aactggcaaa aaa 1713

```

<210> 18
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> 变异链球菌 (Streptococcus mutans)

<400> 18

Met Thr Asp Lys Lys Thr Leu Lys Asp Leu Arg Asn Arg Ser Ser Val
 1 5 10 15

Tyr Asp Ser Met Val Lys Ser Pro Asn Arg Ala Met Leu Arg Ala Thr
 20 25 30

[0025]

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

[0026]

290	295	300
Glu Lys Val Pro His Leu Ala Asp Leu Lys Pro Ser Gly Gln Tyr Val 305 310 315 320		
Phe Gln Asp Leu Tyr Lys Val Gly Gly Val Pro Ala Val Met Lys Tyr 325 330 335		
Leu Leu Lys Asn Gly Phe Leu His Gly Asp Arg Ile Thr Cys Thr Gly 340 345 350		
Lys Thr Val Ala Glu Asn Leu Lys Ala Phe Asp Asp Leu Thr Pro Gly 355 360 365		
Gln Lys Val Ile Met Pro Leu Glu Asn Pro Lys Arg Glu Asp Gly Pro 370 375 380		
Leu Ile Ile Leu His Gly Asn Leu Ala Pro Asp Gly Ala Val Ala Lys 385 390 395 400		
Val Ser Gly Val Lys Val Arg Arg His Val Gly Pro Ala Lys Val Phe 405 410 415		
Asn Ser Glu Glu Glu Ala Ile Glu Ala Val Leu Asn Asp Asp Ile Val 420 425 430		
Asp Gly Asp Val Val Val Val Arg Phe Val Gly Pro Lys Gly Gly Pro 435 440 445		
Gly Met Pro Glu Met Leu Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Gly Lys Gly 450 455 460		
Gln Gly Glu Lys Val Ala Leu Leu Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly 465 470 475 480		
Thr Tyr Gly Leu Val Val Gly His Ile Ala Pro Glu Ala Gln Asp Gly 485 490 495		
Gly Pro Ile Ala Tyr Leu Gln Thr Gly Asp Ile Val Thr Ile Asp Gln 500 505 510		
Asp Thr Lys Glu Leu His Phe Asp Ile Ser Asp Glu Glu Leu Lys His 515 520 525		
Arg Gln Glu Thr Ile Glu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Arg Gly Ile Leu 530 535 540		
Gly Lys Tyr Ala His Ile Val Ser Ser Ala Ser Arg Gly Ala Val Thr 545 550 555 560		

[0027]

Asp Phe Trp Lys Pro Glu Glu Thr Gly Lys Lys
565 570

<210> 19
<211> 1644
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 经密码子优化适于在啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) *kivD* 编码区

<400> 19
atgtatacag taggtgacta tctgttggac agattacacg aattaggtat agaagaaata 60
ttcggagtac caggtagacta caatttgcaa tttctagatc aaattatttc acacaaagat 120
atgaaatggg tgggaaatgc taatgagtta aatgcctcct atatggccga cgggtacgca 180
agaacgaaaa aggctgcggc attcttgact acatttgggtg ttggcgaatt atccgcagtt 240
aatggcttag cgggctccta tgetgagaac ctgcctgttg ttgagatcgt gggatctcct 300
acctcgaaag tgcagaacga agglaaagttt gttcaccata cgttggctga tgggtatttc 360
aagcacttta tgaagatgca cgaaccggtt actgctgcca ggactttatt gacagccgag 420
aatgcaactg ttgaaattga tagagtgttg tctgccttac taaaggaaag aaagccggtt 480
tacatcaatt tacctgtaga tgtagctgcc gctaaggctg aaaaaccatc cttgcctcct 540
aagaaggaaa attccacgtc gaatacatct gatcaagaga ttctgaacaa aatacaggaa 600
agtctgaaga atgccaagaa accaattgta atcacaggcc atgaaattat atcgttcggc 660
ctagagaaga ctgttactca gtttatttca aagactaagt tactatttac tactttgaac 720
tttggtaaat catctgttga tgaagcattg ccctcatttt tggggattta caacggtact 780
ctgtcagagc caaacttgaa ggaatttgtg gaatctgctg attttattct tatgttgggt 840
gtaaagctta ccgattctag tacgggtgca ttactcacc atcttaatga aaataaaatg 900
atttccttga atatcgatga aggtaaaatt ttcaacgaaa gaatccaaaa tttcgacttc 960
gaatccctga tatcatctct tcttgacttg tccgaaattg aatataaagg caagtacata 1020
gataaaaagc aagaagattt tgtaccttct aacgcgctgt tgtcacaaga tagactgttg 1080
caagctgtcg aaaatttgac ccaaagtaat gagacgatcg tggctgaaca aggcacttct 1140
ttcttcgggtg cctcatctat atttctgaaa tcgaaatcac attttatttg tcaacccttg 1200
tggggatcta taggatacac tttccccgca gctctaggca gccaaattgc agataaagaa 1260
tctagacatt tattgtttat cggagatgga tcattgcaac tgactgtcca agaattagga 1320
ctagccatta gagagaagat aaaccaatc tgccttatca ttaataacga tggttacacg 1380
gttgagaggg aaattcatgg tccgaaccag agttataatg acattcctat gtggaattac 1440
tcaaaactgc cagaaagttt cggggcaacg gaagacagag ttgtgtccaa aattgtgaga 1500
acagaaaaatg aattcgtatc cgtgatgaaa gaagctcaag cagatccaaa taggatgtat 1560

[0028]

tggatagaac ttattctagc aaaggagggt gcacctaaag ttttgaaaaa gatgggtaag 1620
ttatttgcag aacaaaacaa gage 1644

<210> 20
<211> 548
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

<400> 20

Met Tyr Thr Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Arg Leu His Glu Leu Gly
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ile Phe Gly Val Pro Gly Asp Tyr Asn Leu Gln Phe Leu
20 25 30

Asp Gln Ile Ile Ser His Lys Asp Met Lys Trp Val Gly Asn Ala Asn
35 40 45

Glu Leu Asn Ala Ser Tyr Met Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Thr Lys Lys
50 55 60

Ala Ala Ala Phe Leu Thr Thr Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Val
65 70 75 80

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

Val Gly Ser Pro Thr Ser Lys Val Gln Asn Glu Gly Lys Phe Val His
100 105 110

His Thr Leu Ala Asp Gly Asp Phe Lys His Phe Met Lys Met His Glu
115 120 125

Pro Val Thr Ala Ala Arg Thr Leu Leu Thr Ala Glu Asn Ala Thr Val
130 135 140

Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Ala Leu Leu Lys Glu Arg Lys Pro Val
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Leu Pro Val Asp Val Ala Ala Ala Lys Ala Glu Lys Pro
165 170 175

Ser Leu Pro Leu Lys Lys Glu Asn Ser Thr Ser Asn Thr Ser Asp Gln
180 185 190

Glu Ile Leu Asn Lys Ile Gln Glu Ser Leu Lys Asn Ala Lys Lys Pro
195 200 205

Ile Val Ile Thr Gly His Glu Ile Ile Ser Phe Gly Leu Glu Lys Thr

[0029]

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

[0030]

Ser Lys Leu Pro Glu Ser Phe Gly Ala Thr Glu Asp Arg Val Val Ser
485 490 495

Lys Ile Val Arg Thr Glu Asn Glu Phe Val Ser Val Met Lys Glu Ala
500 505 510

Gln Ala Asp Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys
515 520 525

Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
530 535 540

Gln Asn Lys Ser
545

<210> 21
<211> 2145
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 构建的嵌合基因

<400> 21
gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg 60
gagaatcttc taacgataaa cccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct 120
acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aagggacgtg 180
caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcggtgaagt gttegccaaa cttttcggtt 240
aacacatgca gtgatgcacg cgcgatgggtg ctaagttaca tatatatata tatatatata 300
tatagccata gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact 360
agcgcgcgca cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgcataa 420
tgggattcca ctttcggttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga 480
ataaaaagag agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat 540
gaacaatggg aacgagttgt ggctgttgcc agggagggtg gtctcact tttaatgtat 600
ggccaaatcg ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt 660
cctccttctt gtcctttctt aattctgttg taattacctt cctttgtaat tttttttgta 720
attattcttc ttaataatcc aaacaaacac acatattaca atagctagct gaggatgaag 780
gcattagttt atcatgggga tcacaaaatt tcgtagaag acaaaccaaa accactctg 840
cagaaacca cagacgttgt ggtaggggtg ttgaaaacaa caatttgagg tactgacttg 900
ggaatataca aaggtaagaa tcctgaagtg gcagatggca gaatcctggg tcatgagggc 960
gttgcgctca ttgaagaagt gggcgaatcc gtgacacaat tcaaaaaggg ggataaagtt 1020
ttaatctcct gcgttactag ctgtggatcg tgtgattatt gcaagaagca actgtattca 1080

[0031]

cactgtagag acggtggctg gatttttaggt tacatgatcg acggtgtcca agccgaatac	1140
gtcagaatac cacatgctga caattcattg tataagatcc cgcaaactat cgatgatgaa	1200
attgcagtac tactgtccga tattttacct actggacatg aaattgggtg tcaatatggt	1260
aacgttcaac caggcgatgc tgtagcaatt gtaggagcag gtcctgttgg aatgtcagtt	1320
ttgttaactg ctcaatttta ctgcctagt accattattg ttatcgacat ggacgaaaac	1380
cgtttacaat tagcgaagga gcttggggcc acacacacta ttaactccgg tactgaaaat	1440
gttgtcgaag ctgtgcatcg tatagcagcc gaaggagtgg atgtagcaat agaagctggt	1500
ggtatacccg caacctggga catctgtcag gaaattgtaa aaccggcgcc tcattatgcc	1560
aacgtgggag ttcattggtg taagggtggac tttgaaattc aaaagttgtg gattaagaat	1620
ctaaccatca ccactggttt ggtaacact aatactacc caatgttgat gaaggtagcc	1680
tctactgata aattgccttt aaagaaaatg attactcaca ggtttgagtt agctgaaatc	1740
gaacacgcac atcaggtttt cttgaatggc gctaaagaaa aagctatgaa gattattcta	1800
tctaattgcag gtgcgccta attaattaag agtaagcgaa tttcttatga tttatgattt	1860
ttattattaa ataagttata aaaaaataa gtgtatacaa attttaaagt gactcttagg	1920
ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg ttgctttctc	1980
aggtatagca tgaggtegct cttattgacc acacctctac cggcatgccg agcaaatgcc	2040
tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa tgagttgatg	2100
aatctcggtg tgtattttat gtcctcagag gacaacacct gtggt	2145

<210> 22

<211> 4280

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体

<400> 22

ggggatcctc tagatcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg gtcatactg	60
tttctgtgt gaaattgtta tccgtcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata	120
aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgtca	180
ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc	240
goggggagag goggtttgcg tattgggcgc tcttccgtt cctcgtcac tgaactcgtg	300
cgtcggctcg ttcggctgcg gcgagcggtg tcagctcact caaaggcggg aatacggtta	360
tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc	420
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc cctgacgag	480
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	540
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgtctctctg ttccgaccct gccgcttacc	600

[0032]

ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgtgt	660
aggtatctca gttcgggtga ggctgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	720
gttcagcccg accgctgcgc cttatccggg aactatcgte ttgagtccaa cccggtaaga	780
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	840
ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta	900
tttggatatc gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	960
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg	1020
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag	1080
tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc	1140
tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact	1200
tggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcacctt tctcagcgat ctgtctattt	1260
cgttcattca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta	1320
ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcacggc tccagattta	1380
tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggctcctgc aactttatcc	1440
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat	1500
agtttgccga acgttggtgc cattgtaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt	1560
atggcttcat tcagctccgg ttcaccaaga tcaaggcgag ttacatgate ccccatgttg	1620
tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca	1680
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta	1740
agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcatt tctgagaata gtgtatgcgg	1800
cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact	1860
ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg	1920
ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt	1980
actttcacca gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga	2040
ataaggcgca caggaatg ttgaatactc ataactctcc tttttcaata ttattgaagc	2100
atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa	2160
caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt	2220
attatcatga cattaacctt taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt	2280
ttcgggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt	2340
ctgtaaggcg atgccgggag cagacaagcc cgtcaggcg cgtcagcggg tgttgccggg	2400
tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatattg	2460
cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca	2520
ttcaggetgc gcaactgttg ggaaggcgca tcgggtcggg cctcttcgct attacgccag	2580

[0033]

ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag	2640
tcacgacggt gtaaaacgac ggccagtga ttcgagctcg gtacccccgg ctctgagaca	2700
gtagtaggtt agtcatecgt ctaccgacgc gcaggaaaag aaagaagcat tgcggattac	2760
gtattctaat gttcagcccc cggaacgcca gcaaatcacc acctatgcgc atgatactga	2820
gtcttgtaca cgctgggctt ccagtgtact gagagtgcac cataccacag cttttcaatt	2880
caattcatca tttttttttt attctttttt ttgatttcgg tttctttgaa atttttttga	2940
ttcggtaate tccgaacaga aggaagaacg aaggaaggag cacagactta gatttggtata	3000
tatacgcata tgtagtgttg aagaaacatg aaattgccca gtattcttaa cccaactgca	3060
cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg	3120
tgctgctact catcctagtc ctgttgcgtc caagctatit aatatcatgc acgaaaagca	3180
aacaaacttg tgtgttcat tggatgttcg taccaccaag gaattactgg agttagtga	3240
agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa aacacatgtg gatattctga ctgatttttc	3300
catggagggc acagttaagc cgctaaaggc attatccgcc aagtacaatt ttttactctt	3360
cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt	3420
atacagaata gcagaatggg cagacattac gaatgcacac ggtgtggtgg gccagggtat	3480
tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga agtaacaaag gaacctagag gccttttgat	3540
gtttagcagaa ttgtcatgca agggtccct atctactgga gaatatacta agggtagctgt	3600
tgacattgcg aagagcgaca aagattttgt tatcggcttt attgctcaa gagacatggg	3660
tggaagagat gaaggttacg attggttgat tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa	3720
gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac cgtggatgat gtggtctcta caggatctga	3780
cattattatt gttggaagag gactatttgc aaagggaagg gatgctaagg tagagggtga	3840
acgttacaga aaagcaggct gggaagcata ttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa	3900
aactgtatta taagtaaag catgtatact aaactcaca attagagctt caatttaatt	3960
atatcagtta ttacclatg cgggttgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc	4020
gcateaggaa attgtaaacg ttaatatattt gttaaaatc gcgttaaatt tttgttaaat	4080
cagctcattt tttaaccaat aggcggaaat cggcaaaatc ttcagccccg ggaacgccag	4140
caaatcacca cccatgcgca tgatactgag tcttgtacac gctgggcttc cagtgtgat	4200
acaacgagtt agccaagggtg agcacggatg tctaaattag aattacgttt taatatcttt	4260
ttttccatat ctagggctag	4280

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

[0034]

<400> 23 gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg	30
<210> 24 <211> 54 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 24 gaacattaga atacgtaatc cgcaatgcac tagtaccaca ggtgttggtcc tctg	54
<210> 25 <211> 54 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 25 cagaggacaa cacctgtggt actagtgcac tgcggattac gtattctaataa gttc	54
<210> 26 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 26 caccttggtc aactcgttgt atcatcac	28
<210> 27 <211> 100 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 27 ttttaagccg aatgagtgac agaaaaagcc cacaacttat caagtgatat tgaacaaagg	60
gcgaaacttc gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg	100
<210> 28 <211> 98 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 28 cccaattggt aaatattcaa caagagacgc gcagtagcta acatgcgaat tgcgtaattc	60

[0035]

acggcgataa caccttggct aactcgttgt atcatcac	98
<210> 29	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
tcgggtttttg caatatgacc tgtggggcc	28
<210> 30	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 30	
caaaagccca tgtcccacac caaaggatg	29
<210> 31	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 31	
caccatcgcg cgtgcatcac tgcattg	26
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 32	
gagaagatgc ggccagcaaa ac	22
<210> 33	
<211> 2745	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 构建的编码区-终止子片段	
<400> 33	
atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta gttctgttta cgattcaatg	60
gttaaatacac ctaatcgatgc tatgttgatgc gcaactggta tgcaagatga agactttgaa	120
aaacctatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta	180

[0036]

catgactttg gtaaactagc caaagtcggt gttaaggaag ctggtgcttg gccagttcag	240
ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa cccaaggaat gcgtttctcc	300
ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg	360
gatgcttttg tagccattgg cggttgtgat aaaaacatgc ccggttctgt tategctatg	420
gctaacatgg atatccagc cttttttgct tacggcggaa caattgcacc tggtaattta	480
gaaggcaaag atategattt agtctctgtc tttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc	540
gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg cttgtcccgg tcttgagggc	600
tgcggtggta tgtatactgc taacacaatg gcgacagcta ttgaagtttt gggacttagc	660
cttccgggtt catctttctca cccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa	720
gctggctcgc ctgttgtcaa aatgctcgaa atgggcttaa aaccttctga ctttttaacg	780
cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggagggtc aaccaactca	840
accttccacc tcttagctat tgcceatgct gctaatgtgg aattgacact tgatgatttc	900
aatactttcc aagaaaaagt tctcatttg gctgatttga aaccttctgg tcaatatgta	960
ttccaagacc tttaacaagg cggaggggta ccagcagtta tgaaatatct ccttaaaaat	1020
ggcttccctc atggtgaccg tatcacttgt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag	1080
gcttttgatg atttaacacc tggtcaaaag gttattatgc cgttgaaaa tcctaaacgt	1140
gaagatggtc cgtcatttat tctccatggg aacttggtc cagacgggtc cgttgccaaa	1200
gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggctctgcta aggtctttta ttctgaagaa	1260
gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg gtgatgttgt tgcgtacgt	1320
tttgtaggac caaaggcggg tcttggtatg cctgaaatgc tttcccttcc atcaatgatt	1380
gttggtaaag ggcaagggtg aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctcagggtgt	1440
acttatggtc ttgtcgtggg tcatactgct cctgaagcac aagatggcgg tccaatcgcc	1500
tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca ctaaggaatt acactttgat	1560
atctccgatg aagagttaaa acatcgtaa gagaccattg aattgccacc gctctattca	1620
cgcggtatcc ttggtaaata tgcacacac gtttcgtctg cttctagggg agccgtaaca	1680
gacttttggg agcctgaaga aactggcaaa aaatgttgct ctggttgctg tggttaagcg	1740
gccgcgttaa ttcaaatata ttgatatagt tttttaatga gtattgaatc tgtttagaaa	1800
taatggaata ttatttttat ttatttattt atattattgg tcggctcttt tcttctgaag	1860
gtcaatgaca aaatgatatg aaggaaataa tgatttctaa aattttacaa cgtaagatat	1920
ttttacaaaa gcctagctca tcttttgtea tgcactattt tactcacgct tgaaattaac	1980
ggccagtcca ctgcggagtc atttcaaagt catcctaate gatctatcgt ttttgatagc	2040
tcattttgga gttecgatg gtcttctgtt attcacaact gttttaattt ttatttcatt	2100
ctggaactct tcgagttctt tgtaaagtct ttcatatag cttactttat cctccaacat	2160

[0037]

atttaacttc atgtcaatth eggetcttaa attttccaca tcatcaagtt caacatcate	2220
ttttaacttg aattttattct ctagctcttc caaccaagcc tcattgctcc ttgatttact	2280
ggtgaaaagt gatacacttt ggcgcgaatc caggtaaaaa ctttcttgca aagaattcac	2340
caattttctcg acatcatagt acaatttggt ttgttctccc atcacaattt aatatacctg	2400
atggattctt atgaagcgtt gggtaatgga cgtgtcactc tacttcgcct ttttcctac	2460
tccttttagt acggaagaca atgctaataa ataagagggt aataataata ttattaatcg	2520
gcaaaaaaga ttaaagcca agcgtttaat tatcagaaag caaacgtcgt accaatcctt	2580
gaatgcttcc caattgtata ttaagagtca tcacagcaac atattcttgt tattaaatta	2640
attattattg atttttgata ttgtataaaa aaaccaaata tgtataaaaa aagtgaataa	2700
aaaataccaa gtatggagaa atatattaga agtctatacg ttaaa	2745

<210> 34
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 34	
tcctttctca attattattt tctactcata acctcagca aaataacaca gtcaaatcaa	60
tcaaagtatg actgacaaaa aaactcttaa agacttaag	99

<210> 35
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 35	
gaacattaga atacgtaatc cgcaatgett ctttcttttc cgtttaacgt atagacttct	60
aatatatttc tccatac	77

<210> 36
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 36	
aaacggaaaa gaaagaagca ttgcggatta cgtattctaa tgttc	45

<210> 37
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0038]

<220>		
<223>	引物	
<400>	37	
tat t t t t t c g t	tacataaaaa	tgcttataaa
act t t t a a c t a	ataattagag	attaaatcgc
		60
cac c t t g g c t	aactcgttgt	atcatcac
		88
<210>	38	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	38	
gac t t t t t g g a	agcctgaaga	aactggc
		27
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	39	
ctt g g c a g c a	acaggactag	
		20
<210>	40	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
ccaggccaat	tcaacagact	gtcggc
		26
<210>	41	
<211>	2347	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	构建的具有用于HIS基因置换和标记切除的侧接同源重复序列的URA3标记	
<400>	41	
gcattgcgga	ttacgtattc	taatgttcag
gtgctggaag	aagagctgct	taaccgccgc
		60
gcccagggtg	aagatccacg	ctactttacc
ctgcgtcgtc	tggatttcgg	cggtgtcgt
		120
ctttcgctgg	caacgccggt	tgatgaagcc
tgggacggtc	cgctctcctt	aaacggtaaa
		180
cgtatcgcca	cctcttatcc	tcacctgetc
aagcgttata	tcgaccagaa	aggcatctct
		240
tttaaactct	gcttactgaa	cggttctggt
gaagtcgccc	cgcgtgccgg	actggcggat
		300
gcgatttgcg	atctggtttc	caccgggtgcc
acgctggaag	ctaacggcct	gcgcgaagtc
		360

[0039]

gaagttatct atcgctcgaa agcctgcctg attcaacgcg atggcgaaat ggaagaatcc	420
aaacagcaac tgatcgacaa actgctgacc cgtattcagg gtgtgatcca ggcgcgcgaa	480
tcaaaataca tcatgatgca cgcaccgacc gaacgtctgg atgaagtcac ggtacctact	540
gagagtgcac cataccacag cttttcaatt caattcatca tttttttttt attctttttt	600
ttgatttcgg tttctttgaa atttttttga ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacg	660
aaggaaggag cacagactta gattggtata tatacgcata tgtagtgttg aagaaacatg	720
aaattgccca gtattcttaa cccaactgca cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata	780
aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg tgctgctact catcctagtc ctgttctgc	840
caagctatct aatatcatgc acgaaaagca aacaaacttg tgtgcttcat tggatgttcg	900
taccaccaag gaattactgg agttagtga agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa	960
aacacatgtg gatattctga ctgatttttc catggagggc acagttaagc cgctaaaggc	1020
attatccgcc aagtacaatt ttttactctt cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa	1080
tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg cagacattac	1140
gaatgcacac ggtgtggtgg gccagggtat tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga	1200
agtaacaaag gaacctagag gccttttgat gtttagcagaa ttgtcatgca agggctccct	1260
atctactgga gaatatacta aggttactgt tgacattgcg aagagcgaca aagattttgt	1320
tateggcttt attgctcaaa gagacatggg tggaagagat gaaggttacg attggttgat	1380
tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac	1440
cgtggatgat gtggtctcta caggatctga cattattatt gttggaagag gactatttgc	1500
aaagggaagg gatgctaagg tagagggtga acgttacaga aaagcaggct gggaagcata	1560
tttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa aactgtatta taagtaaatg catgtatact	1620
aaactcacia attagagctt caatttaatt atatcagtta ttaccctatg cgggttgaaa	1680
taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggaa attgtaaagc ttaatatctt	1740
gttaaaattc gcgttaaat tttgttaaat cagctcattt ttaaccaat aggccgaaat	1800
cggcaaaatc tctagagtgc tggaagaaga gctgcttaac cgcgcgcgcc aggtgaaga	1860
tccacgctac ttaccctgc gtcgtctgga tttcggcggc tgcgtctttt cgtggcaac	1920
gccggttgat gaagcctggg acggtccgct ctctttaaac ggtaaacgta tcgccacctc	1980
ttatcctcac ctgctcaagc gttatctcga ccagaaaggc atctctttta aatcctgctt	2040
actgaacggt tctgttgaag tcgccccgcg tgccggactg gcggatgcga tttgcgatct	2100
ggtttccacc ggtgccacgc tggaagctaa cggcctgcgc gaagtcgaag ttatctatcg	2160
ctcgaaagcc tcctgattc aacgcgatgg cgaaatggaa gaatccaaac agcaactgat	2220
cgacaaactg ctgaccgta ttcagggtgt gatccaggcg cgcgaaatcaa aatacatcat	2280
gatgcacgca ccgaccgaac gtctggatga agtcaccag tgatgatata acgagttagc	2340

[0040]

caaggtg	2347
<210> 42	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 42	
cttcgaagaa tatactaaaa aatgagcagg caagataaac gaaggcaaag gcattgcgga	60
ttacgtattc taatgttcag	80
<210> 43	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 43	
cttcgaagaa tatactaaaa aatgagcagg caagataaac gaaggcaaag gcattgcgga	60
ttacgtattc taatgttcag	80
<210> 44	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 44	
gacttgaata atgcagcggc gcttgc	26
<210> 45	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 45	
ccaccctctt caattagcta agatcatagc	30
<210> 46	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 46	
aaaaattgat tctcatcgta aatgc	25

[0041]

<210>	47	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	47	
ctgcagcgag gagccgtaat		20
<210>	48	
<211>	16387	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	质粒构建体	
<400>	48	
tcccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgttc atgtatgtat ctgtatttaa		60
aacacttttg tattattttt cctcatatat gtgtataggt ttatacggat gatttaatta		120
ttacttcacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tgttactagt tagaaaaaga		180
catttttgcg gtcagtcact gtcaagagat tcttttgcg gcatttcctc tagaagcaaa		240
aagagcgatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca acgcaatatg		300
gattgtcaga atcatataaa agagaagcaa ataactcctt gtcttgtatc aattgcatta		360
taatatcttc ttgttagtgc aatatcatat agaagtcac gaaatagata ttaagaaaaa		420
caaaactgtac aatcaatcaa tcaatcatcg ctgaggatgt tgacaaaagc aacaaaagaa		480
caaaaatccc ttgtgaaaaa cagaggggcg gagcttggtg ttgattgctt agtggagcaa		540
ggtgtcacac atgtatttgg cattccagggt gcaaaaattg atgcggtatt tgacgcttta		600
caagataaag gacctgaaat tatcgttgcc cggcacgaac aaaacgcagc attcatggcc		660
caagcagtcg gccgtttaac tggaaaaccg ggagtcgtgt tagtcacatc aggaccgggt		720
gcctctaact tggcaacagg cctgctgaca gcgaacactg aaggagacct tgcgttgcg		780
cttgctggaa acgtgatecg tgcagatcgt ttaaaacgga cacatcaatc tttggataat		840
gcggcgctat tccagccgat tacaaaatac agtgtagaag ttcaagatgt aaaaaatata		900
ccggaagctg ttacaaatgc atttaggata gcgtcagcag ggcaggctgg ggccgctttt		960
gtgagctttc cgcaagatgt tgtgaatgaa gtcacaaata cgaaaaacgt gcgtgctgtt		1020
gcagcgccaa aactcggtcc tgcagcagat gatgcaatca gtgcggccat agcaaaaatc		1080
caaacagcaa aacttcctgt cgttttggtc ggcatgaaag gcggaagacc ggaagcaatt		1140
aaagcggttc gcaagctttt gaaaaagggt cagcttccat ttgttgaaac atatcaagct		1200
gccggtaccc tttctagaga tttagaggat caatatattt gccgtatcgg tttgttccgc		1260
aaccagcctg gcgatttact gctagagcag gcagatgttg ttctgacgat cggctatgac		1320

[0042]

ccgattgaat atgatccgaa attcttgaat atcaatggag accggacaat tatccattta	1380
gacgagatta tcgtgacat tgatcatgct taccagcctg atcttgaatt gatcggtgac	1440
attcegtcca cgatcaatca tategaacac gatgctgtga aagtggaatt tgcagagcgt	1500
gagcagaaaa tcctttctga tttaaaacaa tatatgcatg aaggtagca ggtgcctgca	1560
gatttgaaat cagacagagc gcacctctt gaaatcgta aagagttgcg taatgcagtc	1620
gatgatcatg ttacagtaac ttgcgatatc ggttcgcacg ccatttggat gtcacgttat	1680
ttccgcagct acgagccgtt aacattaatg atcagtaacg gtatgcaaac actcggcggt	1740
gcgcttctctt gggcaatcgg cgcttcattg gtgaaaccgg gagaaaaagt ggtttctgtc	1800
tctggtgacg gcggtttctt attctcagca atggaattag agacagcagt tcgactaaaa	1860
gcaccaattg tacacattgt atggaacgac agcacatatg acatggttgc attccagcaa	1920
ttgaaaaaat ataaccgtac atctgcggtc gatttcggaa atatcgatat cgtgaaatat	1980
gcggaaagct tcggagcaac tggcttgcgc gtagaatcac cagaccagct ggcagatgtt	2040
ctgcgtcaag gcatgaacgc tgaaggctct gtcacatcg atgtcccggt tgactacagt	2100
gataacatta atttagcaag tgacaagctt ccgaaagaat tcggggaact catgaaaacg	2160
aaagctctct agttaattaa tcatgtaatt agttatgtca cgttacatt cagccctcc	2220
ccccacatcc gctctaaccg aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat	2280
ttatTTTTTT atagtattgt tagtattaag aacgttattt atatttcaaa tttttctttt	2340
ttttctgtac agacgcgtgt acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaagg	2400
tttgggaacg tcgaaggctt taatttgcgg gcggccgctc tagaactagt accacaggtg	2460
ttgtcctctg aggacataaa atacacaccg agattcatca actcattgct ggagttagca	2520
tatctacaat tgggtgaaat ggggagcgat ttgcaggcat ttgctcgga tgccggtaga	2580
ggtgtggtca ataagagcga cctcatgcta tacctgagaa agcaacctga cctacaggaa	2640
agagttactc aagaataaga attttcgttt taaaacctaa gagtcacttt aaaatttgta	2700
tacacttatt tttttataa cttatttaat aataaaaaac ataatcata agaaattcgc	2760
ttactcttaa ttaatcaagc atctaaaaca caaccgttgg aagcgttggg aaccaactta	2820
gcatacttgg atagagtacc tcttgtgtaa cgaggtagg gtgcaacca actttgttta	2880
cgttgagcca ttctcttacc agagactaat aggtcaatct tgttattatc agcatcaatg	2940
ataatctcat cgccgtctct gaccaaccg ataggaccac cttcagcggc ttcgggaaca	3000
atgtggccga ttaagaaccc gtgagaacca ccagagaatc taccatcagt caacaatgca	3060
acatctttac ccaaacgta acccatcaga gcagaggaag gcttttagcat ttcaggcata	3120
cctggtgcac ctcttggaac ttcatatctg ataacaacaa cggttttttc accctcttg	3180
atttcacctc ttccaaggc ttcaataaag gcaccttctt cttcgaacac acgtgtctta	3240
cccttgaagt aagtacctt cttaccggta attttaccba cagctccacc tgggtgccaat	3300

[0043]

gaaccgtaca gaatttgcaa gtgaccgttg gccttgattg ggtgggagag tggcttaata	3360
atctcttgtc cttcaggtag gcttggtgct ttctttgcac gttctgcaa agtgtcacccg	3420
gtaacagtca ttgtgttacc gtgcaacatg ttgttttcat atagatactt aatcacagat	3480
tgggtaccac caacgttaat caaatcggcc atgacgtatt taccagaagg ttgaagtca	3540
ccgatcaatg gtgtagtata actgattctt tggaaatcat ctggtgacaa cttgacaccc	3600
gcagagttag caacagccac caaatgcaaa acagcattag tggaccaccc ggttgcaacg	3660
acataagtaa tggcgttttc aaaagcctct tttgtgagga tatcacgagg taaaataccc	3720
aattccattg tcttcttgat gtattcacca atgttgcac actcagctaa cttctccttg	3780
gaaacggctg ggaaggaaga ggagtttgga atggtcaaac ctagcacttc agcggcagaa	3840
gccattgtgt tggcagtata cataccacca caagaaccag gacctgggca tgcattgttc	3900
acaacatctt ctctttcttc ttcagtgaat tgcttggaat tatattcacc gtaggattgg	3960
aacgcagaga cgatatcgat gtttttagag atcctgttaa aacctctagt ggagtagtag	4020
atgtaatcaa tgaagcgga gccaaaagac cagagtagag gcctatagaa gaaactgcga	4080
taccttttgt gatggctaaa caaacagaca tctttttata tgtttttact tctgtatata	4140
gtgaagtagt aagtgataag cgaatttggc taagaacgtt gtaagtgaac aaggacctc	4200
ttttgccttt caaaaaagga ttaaatggag ttaatcattg agatttagtt ttcgttagat	4260
tctgtatccc taaataactc ccttaccgga cggaaggca caaaagactt gaataatagc	4320
aaacggccag tagccaagac caaataatac tagagttaac tgatggtctt aaacaggcat	4380
tacgtggtga actccaagac caatatacaa aatatcgata agttattctt gccaccaat	4440
ttaaggagcc tacatcagga cagtagtacc attcctcaga gaagaggat acataacaag	4500
aaaatcgctg gaacacctta tataacttag cccgttattg agctaaaaaa ccttgcaaaa	4560
tttcctatga ataagaatac ttcagacgtg ataaaaattt actttctaac tcttctcacg	4620
ctgccccat ctgttcttc gctctaccgt gagaaataaa gcatcgagta cggcagttcg	4680
ctgtcactga actaaaacaa taaggctagt tcgaatgat aacttgcttg ctgtcaaaact	4740
tctgagttgc cgctgatgtg acactgtgac aataaattca aaccggttat agcggctctc	4800
tccggtaccg gttctgccac ctccaataga gctcagtagg agtcagaacc tctgcggtgg	4860
ctgtcagtga ctcatccgcg tttcgtaagt tgtgcgcgtg cacatttcgc cegttccgc	4920
tcattcttga gcaggcgga attttcatca cgctgtagga cgcaaaaaaa aaataattaa	4980
tcgtacaaga atcttggaat aaaaattgaa aaattttgta taaaagggat gacctaaact	5040
gactcaatgg cttttacacc cagtattttc ctttctcttg tttgttaca ttatagaagc	5100
aagacaaaa catatagaca acctattcct aggagttata tttttttacc ctaccagcaa	5160
tataagtaaa aaactagtat gaagggtgtt tacgataaag actgcgatct gagcatcatc	5220
cagggaaga aggttgcctat tataggatat ggttcccaag gacacgcaca agccttgaac	5280

[0044]

ttgaaagatt ctggggtcga cgtgacagta ggtctgtata aaggtgctgc tgatgcagca	5340
aaggctgaag cacatggctt taaagtcaca gatgttgcag cggctgttgc tggcgtgat	5400
ttagtcatga ttttaattcc agatgaattt caatcgcaat tgtacaaaaa tgaaatagaa	5460
ccaaacatta agaagggcgc taccttggcc ttcagtcattg gatttgccat tcattacaat	5520
caagtagtcc ccagggcaga tttggacgtt attatgattg cacctaaggc tccggggcat	5580
actgttagga gcgaatttgt taagggtggt ggtattccag atttgatcgc tatataccaa	5640
gacgttagcg gaaacgctaa gaatgtagct ttaagctacg cagcaggagt tgggtggcggg	5700
agaacgggta taatagaaac cactttttaa gacgagactg agacagattt atttgagaa	5760
caagcggttc tgtgcggagg aactgttgaa ttggttaaag caggcttga gacgctgtc	5820
gaagcagggt acgctcccg aatggcatac ttcgaatgtc tacatgaatt gaagttgata	5880
gtagacttaa tgtatgaagg tggatatagct aatatgaact attccatttc aaataatgca	5940
gaatatggtg agtatgtcac cggacctgaa gtcattaacg cagaatcaag acaagccatg	6000
agaaatgcct tgaaacgtat ccaggacggg gaataccta agatgttcat aagtgaaggc	6060
gtacagggtt acccgagtat gactgctaaa agaagaaaca atgcagcaca tggtatcgaa	6120
attattggtg aacagttaag gtctatgatg ccctggatcg gtgctaataa gatcgtagac	6180
aaggcgaaaa attaaggccc tgcaggccta tcaagtgtg gaaacttttt ctcttggaa	6240
ttttgcaaca tcaagtcata gtcaattgaa ttgacccaat ttcacattta agattttttt	6300
ttttcatcc gacatacatc tgtacactag gaagccctgt ttttctgaag cagcttcaaa	6360
tatatatatt ttttacatat ttattatgat tcaatgaaca atctaattaa atcgaaaaca	6420
agaaccgaaa cgcgaataaa taattttatt agatggtgac aagtgtataa gtccatcatg	6480
ggacagctac gatttctctt tcggttttgg ctgagctact ggttgctgtg acgcagcggc	6540
attagcggcg cgttatgagc taccctcgtg gcctgaaaga tggcgggaat aaagcggaac	6600
taaaaattac tgactgagcc atattgaggt caatttgtca actcgtcaag tcacgtttgg	6660
tggacggccc ctttccaacg aatcgtatat actaacatgc gcgcgcttc tatatacaca	6720
tatacatata tatatatata tatatgtgtg cgtgtatgtg tacacctgta ttttaatttc	6780
ttactcggcg gtttttcttt tttctcaatt cttggcttcc tctttctcga gtatataatt	6840
tttcaggtaa aatttagtac gatagtaaaa tacttctcga actcgtcaca tatacgtgta	6900
cataatgtct gaaccagctc aaaagaaaca aaaggttgct aacaactctc tagagcggcc	6960
gcccgc aaat taaagccttc gagegtccca aaaccttctc aagcaagggt ttcagtataa	7020
tgttacatgc gtacacgcgt ctgtacagaa aaaaaagaaa aatttgaaat ataaataacg	7080
ttcttaatac taacataact ataaaaaat aaatagggac ctagacttca ggttgtctaa	7140
ctccttcttt ttcggttaga gcggatgtgg ggggagggcg tgaatgtaag cgtgacataa	7200
ctaattacat gattaattaa ttattgggtt tctgggtctca actttctgac ttccttacca	7260

[0045]

accttccaga tttccatggt tctgatgggt tctaattcct tttctagctt ttctctgtag	7320
tcaggttgag agttgaattc caaagatctc ttggtttcgg taccgttctt ggtagattcg	7380
tacaagtctt ggaaaacagg ctccaagca ttcttgaaga ttgggtacca gtccaaagca	7440
cctcttctgg cgggtgtgga acaagcatcg tacatgtaat ccataccgta cttaccgata	7500
aattgggtata gagattgggt agcttcttcg acggtttcgt tgaaagcttc agatggggag	7560
tgaccgtttt ctctcaagac gtctgtattga gccagaaca taccgtggat accacccatt	7620
aaacaacctc ttccaccgta caagtcagag ttgacttctc ttctgaaagt ggtttggtaa	7680
acgtaaccgg aaccaatggc aacggccaaa gcttgggcct ttctgtgagc cttaccgggtg	7740
acatcgttcc agacggcgta agaagagtta ataccacgac cttccttgaa caaagatctg	7800
acagttctac cggaacctt tggagcaacc aagataacat ctaagtcctt tgggtggtca	7860
acgtgagtca agtccttgaa gactggggag aaaccgtggg agaagtacaa agtcttacc	7920
ttggtaaca atggcttgat agcaggccag gtttctgatt gagcgcatc ggacaacaag	7980
ttcataacgt aactacctc cttgatagca tctcaacag tgaacaagtt cttgcctgga	8040
acccaacctg cttcgatggc agccttccaa gaagcaccat ctttacggac accaatgata	8100
acgttcaaac cgttgtctct caagttcaaa ccttgaccgt aacctggga accgtaaccg	8160
atcaaagcaa aagtgtcgtt cttgaagtag tccaacaact tttctcttgg ccagtcagct	8220
cttctgtaga cggtttcaac agtaccaccg aagttgattt gcttcaacat cctcagctct	8280
agatttgaat atgtattact tggttatggt tatatatgac aaaagaaaaa gaagaacaga	8340
agaataacgc aaggaagaac aataactgaa attgatagag aagtattatg tctttgtctt	8400
tttataataa atcaagtga gaaatccgtt agacaacatg agggataaaa tttacgtgg	8460
gcgaagaaga aggaaaaaag tttttgtgag ggcgtaattg aagcgatctg ttgattgtag	8520
atTTTTTTTT tttgaggagt caaagtcaga agagaacaga caaatggat taaccatcca	8580
atactTTTTT ggagcaacgc taagctcatg cttttccatt ggttacgtgc tcagttgtta	8640
gatattggaaa gagaggatgc tcacggcagc gtgactccaa ttgagcccg aagagaggat	8700
gccacgtttt cccgacggct gctagaatgg aaaaaggaaa aatagaagaa tccattcct	8760
atcattatTT acgtaatgac ccacacattt ttgagatttt caactattac gtattacgat	8820
aatcctgctg tcattatcat tattatctat atcgacgtat gcaacgtatg tgaagccaag	8880
taggcaatta tttagtactg tcagtattgt tattcatttc agatctatcc gcggtggagc	8940
tcgaattcac tggcgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa	9000
cttaategcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggccgc	9060
accgategcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgct gatgcggtat	9120
tttctcctta cgcctctgtg cggatattca caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtacg	9180
cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta	9240

[0046]

cacttgccag cgccttagcg cccgctcctt tcgctttctt ccttccttt ctcgccacgt	9300
tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg	9360
ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggcat	9420
cgccttgata gacggttttt cgcctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac	9480
tcttgttcca aactggaaca aactcaact ctatctcggg ctattctttt gatttataag	9540
ggattttgcc gatttcggtc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg	9600
cgaattttta caaatatta acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct	9660
ctgatgcgcg atagttaagc cagcccgac acccgccaac acccgctgac gcgcctgac	9720
ggccttgtct gtcceggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca	9780
tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac	9840
gcctattttt ataggttaat gtcatgataa taatggttcc ttagacgtca ggtggcactt	9900
ttcggggaaa tgtgcggga accctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt	9960
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	10020
tgagtattca acatttcctg gtcgccctta ttcctttttt tgcggcattt tgccttctg	10080
tttttgctca ccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	10140
gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttgccccg	10200
aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg gtattatccc	10260
gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg	10320
ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	10380
gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttactctg acaacgatcg	10440
gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgcctg	10500
atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc	10560
ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt	10620
cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct	10680
cggcccttcc ggttggttg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc	10740
gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	10800
cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag atagggtcct	10860
cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt	10920
taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga	10980
ccaaaaatcc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca	11040
aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac	11100
caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg	11160
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagttag ccgtagttag	11220

[0047]

gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac	11280
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttacccg gttggactca agacgatagt	11340
taccggataa ggccgcagcg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg	11400
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacacgcgtga gctatgagaa agcgcaccgc	11460
ttcccgaagg gaaaaaggcg gacaggatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc	11520
gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc	11580
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa	11640
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt	11700
tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg	11760
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggag	11820
agcgcaccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc	11880
acgacagggt tcccgaactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	11940
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	12000
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctt	12060
ttctttccaa tttttttttt ttcttcatta taaaaatcat tacgaccgag attcccgggt	12120
aataactgat ataattaaat tgaagctcta atttgtgagt ttagtataca tgcatttact	12180
tataatacag ttttttagtt ttgctggccg catcttctca aatatgcttc ccagcctgct	12240
ttctgtaac gttcaccttc taccttagca tcccttccct ttgcaaatag tcctcttcca	12300
acaataataa tgcagatcc tgtagagacc acatcatcca cggttctata ctgttgaccc	12360
aatgcgtctc ccttgctatc taaacceaca cgggtgtca taatcaacca atcgtaacct	12420
tcactctctc caccatgtc tctttgagca ataaagccga taacaaaatc tttgtcgtc	12480
ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat tctccagtag ataggagacc cttgcatgac	12540
aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt tcctttgtta cttcttctgc cgctgtctc	12600
aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct	12660
gtattctgt atacaccgc agagtactgc aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat	12720
ttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac ttggcggata atgccttag cggttaact	12780
gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg	12840
ggacctaatg cttcaactaa ctccagtaat tccttggttg tacgaacatc caatgaagca	12900
cacaagtttg ttgcttttc gtgatgata ttaaatagct tggcagcaac aggactagga	12960
tgagtagcag cagtttctt atatgtagct ttcgacatga tttatcttcg tttcctgcag	13020
gtttttgttc tgtgcagttg ggtaagaat actgggcaat ttcatgttcc ttcaacacta	13080
catatgcgta tatataccaa tctaagcttg tgctcttcc ttcgttcttc cttctgttcg	13140
gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa	13200

[0048]

aatgatgaat tgaaaagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagtatactc cgtctactgt	13260
acgatacact tccgtcagg tccttgtcct ttaacgagge cttaccactc ttttgttact	13320
ctattgatec agctcagcaa aggcagtgtg atctaagatt ctatcttcgc gatgtagtaa	13380
aactagctag accgagaaaag agactagaaa tgcaaaaaggc acttctacaa tggctgccat	13440
cattattatc cgatgtgacg ctgcattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	13500
tttttttttt tttttttgta caaatatcat aaaaaagag aatcttttta agcaaggatt	13560
ttcttaactt cttcggcgac agcatcacgc acttcggtgg tactgttgga accacctaaa	13620
tcaccagttc tgatacctgc atccaaaacc tttttaactg catcttcaat ggctttacct	13680
tcttcaggca agttcaatga caatttcaac atcattgcag cagacaagat agtggcgata	13740
gggttgacct tattctttgg caaatctgga gcggaaccat ggcatggttc gtacaaacca	13800
aatgcggtgt tcttgtctgg caaagaggcc aaggacgcag atggcaacaa acccaaggag	13860
cctgggataa cggaggcttc atcggagatg atatcaccaa acatgttget ggtgattata	13920
ataccattta ggtgggttgg gttcttaact aggatcatgg cggcagaatc aatcaattga	13980
tgttgaactt tcaatgtagg gaattcggtc ttgatggttt cctccacagt tttctccat	14040
aatcttgaag aggccaaaac attagcttta tccaaggacc aaataggcaa tggtggetca	14100
tgttgtaggg ccatgaaagc ggccattctt gtgattcttt gcacttctgg aacggtgtat	14160
tgttcactat cccaagcgac accatcacca tcgtcttcct ttctcttacc aaagtaaata	14220
cctcccacta attctctaac aacaacgaag tcagtacctt tagcaaattg tggettgatt	14280
ggagataagt ctaaaagaga gtcggatgca aagttacatg gtcttaagtt ggcgtacaat	14340
tgaagtctt tacggatttt tagtaaacct tgttcaggte taacactacc ggtaccccat	14400
ttaggaccac ccacagcacc taacaaaacg gcatcagcct tcttggagge ttccagcgcc	14460
tcactctgga gtggaacacc tgtagcatcg atagcagcac caccaattaa atgattttcg	14520
aaatcgaact tgacattgga acgaacatca gaaatagctt taagaacctt aatggcttcg	14580
gctgtgattt cttgaccaac gtggtcacct ggcaaaacga cgatcttctt aggggcagac	14640
attacaatgg tatatccttg aaatatatat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	14700
tgcagettct caatgatatt cgaatacgct ttgaggagat acagcctaata atccgacaaa	14760
ctgttttaca gatttacgat cgtacttggt acccatcatt gaattttgaa catccgaacc	14820
tgggagtttt cctgaaaca gatagtatat ttgaacctgt ataataatat atagtctagc	14880
gctttacgga agacaatgta tgtatttcgg ttcctggaga aactattgca tctattgcac	14940
aggtaatctt gcacgtcgca tccccggttc attttctgcg ttccatctt gcacttcaat	15000
agcatatctt tgttaacgaa gcactctgtc ttcattttgt agaacaaaaa tgcaacgcga	15060
gagcgctaata ttttcaaaca aagaatctga gtgcatttt tacagaacag aaatgcaacg	15120
cgaagcgct attttaccac cgaagaatct gtgcttcatt tttgtaaaac aaaaatgcaa	15180

[0049]

cgcgagagcgc ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg	15240
caacgcgaga gcgctatttt accaacaag aatctatact tcttttttgt tctacaaaa	15300
tgcacccga gagecgtatt ttctaacaa agcatcttag attacttttt ttctccttg	15360
tgcgctctat aatgcagtct cttgataact ttttgactg taggtccgtt aaggtagaa	15420
gaaggtact ttggtgtcta tttctcttc cataaaaaa gcctgactcc acttcccgcg	15480
tttactgatt actagcgaag ctgcgggtgc atttttcaa gataaaggca tccccgatta	15540
tattctatac cgatgtggat tgcgcatact ttgtgaacag aaagtgatag cgttgatgat	15600
tcttcattgg tcagaaaatt atgaacggtt tcttctattt tgtctctata tactacgtat	15660
aggaaatggt tacattttcg tattgttttc gattcactct atgaatagtt cttactacaa	15720
ttttttgtc taaagagtaa tactagagat aaacataaaa aatgtagagg tcgagtttag	15780
atgcaagttc aaggagcgaa aggtggatgg gtaggttata tagggatata gcacagagat	15840
atatagcaaa gagatacttt tgagcaatgt ttgtggaagc ggtattcgca atattttagt	15900
agctcgttac agtccggtgc gtttttggtt ttttgaaagt gcgtcttcag agcgttttg	15960
gttttcaaaa gcgctctgaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cggaatagga	16020
acttcaaagc gtttccgaaa acgagcgctt ccgaaaatgc aacgcgagct gcgcacatac	16080
agctcactgt tcacgtcgca cctatatctg cgtgttgctt gtatatatat atacatgaga	16140
agaacggcat agtgcgtgtt tatgcttaaa tgcgtactta tatgcgtcta tttatgtagg	16200
atgaaaggta gtctagtacc tcctgtgata ttatccatt ccatgcgggg tatcgtatgc	16260
ttccttcagc actacccttt agctgttcta tatgctgcca ctctcaatt ggattagtct	16320
catccttcaa tgctatcatt tcctttgata ttggatcata tgcatagtac cgagaaacta	16380
gaggatc	16387

<210> 49
 <211> 448
 <212> DNA
 <213> 啤酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 49	
cccattaccg acatttgggc gctatactg catatgttca tgtatgtatc tgtattttaa	60
acacttttgt attattttct ctcatatatg tgtatagggt tatacggatg atttaattat	120
tacttcacca ccctttatct caggctgata tottagcctt gttactagtt agaaaaagac	180
atttttgctg tcagtcactg tcaagagatt cttttgctgg catttcttct agaagcaaaa	240
agagcgatgc gtcttttccg ctgaaccgtt ccagcaaaaa agactaccaa cgcaatatgg	300
attgtcagaa tcatataaaa gagaagcaaa taactccttg tcttgtatca attgcattat	360
aatatcttct tgttagtgca atatcatata gaagtcacg aaatagatat taagaaaaac	420
aaactgtaca atcaatcaat caatcatc	448

[0050]

<210>	50	
<211>	250	
<212>	DNA	
<213>	啤酒糖酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
<400>	50	
	ccgcaaatta aagccttcga gcgteccaaa accttctcaa gcaaggtttt cagtataatg	60
	ttacatgcgt acacgcgtct gtacagaaaa aaaagaaaaa ttigaaatat aaataacgtt	120
	cttaatacta acataactat aaaaaataa atagggacct agacttcagg ttgtctaact	180
	ccttcctttt cggtagagc ggatgtgggg ggaggcggtg aatgtaagcg tgacataact	240
	aattacatga	250
<210>	51	
<211>	1181	
<212>	DNA	
<213>	啤酒糖酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
<400>	51	
	taaaacctct agtggagtag tagatgtaat caatgaagcg gaagccaaaa gaccagagta	60
	gaggcctata gaagaaactg cgataccttt tgtgatggct aaacaaacag acatcttttt	120
	atatgttttt acttctgtat atcgtgaagt agtaagtgat aagcgaattt ggctaagaac	180
	gttgtaagtg aacaaggac ctcttttggc ttccaaaaaa ggattaaatg gagttaatca	240
	ttgagattta gttttcgtta gattctgtat ccctaaataa ctcccttacc cgacgggaag	300
	gcacaaaaga cttgaataat agcaaacggc cagtagccaa gaccaaataa tactagagtt	360
	aactgatggc cttaaacagg cattacgtgg tgaactccaa gaccaatata caaaatatcg	420
	ataagttatt cttgcccacc aatttaagga gcctacatca ggacagtagt accattcctc	480
	agagaagagg tatacataac aagaaaatcg cgtgaacacc ttatataact tagcccgta	540
	ttgagctaaa aaaccttgca aaatttecta tgaataagaa tacttcagac gtgataaaaa	600
	tttactttct aactcttctc acgtgcccc tatctgttct tccgtctac cgtgagaaat	660
	aaagcatcga gtacggcagt tcgtgtcac tgaactaaaa caataaggct agttcgaatg	720
	atgaacttgc ttgctgtcaa acttctgagt tgcgctgat gtgacactgt gacaataaat	780
	tcaaacgggt tatagcggtc tcctccggtc ccggttctgc cacctccaat agagctcagt	840
	aggagtcaga acctctgcgg tggtgtcag tgactcatcc gcgtttcgta agttgtgcgc	900
	gtgcacattt cgeccgttcc cgtcatctt gcagcaggcg gaaattttca tcacgtgta	960
	ggacgcaaaa aaaaaataat taatcgtaca agaattcttg aaaaaaatt gaaaaatttt	1020
	gtataaaagg gatgacctaa cttgactcaa tggtttttac acccagtatt ttccctttcc	1080
	ttgtttgtta caattataga agcaagacaa aaacatatag acaacctatt cctaggagtt	1140
	atattttttt accctaccag caatataagt aaaaaactag t	1181
<210>	52	
<211>	759	

[0051]

<212> DNA
 <213> 啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
 <400> 52
 ggccctgcag gcctatcaag tgctggaac tttttctctt ggaatttttg caacatcaag 60
 tcatagtcaa ttgaattgac ccaatttcac atttaagatt tttttttttt catccgacat 120
 acatctgtac actaggaagc cctgtttttc tgaagcagct tcaaatatat atatttttta 180
 catattttatt atgattcaat gaacaatcta attaaatcga aaacaagaac cgaaacgcga 240
 ataaataatt tatttagatg gtgacaagtg tataagtctt catcgggaca gctacgattt 300
 ctctttcggg tttggctgag ctactgggtg ctgtgacgca ggggcattag cgcggcggtta 360
 tgagctaccc tcgtggcctg aaagatggcg ggaataaagc ggaactaaaa attactgact 420
 gagecatatt gaggtcaatt tgtcaactcg tcaagtcacg tttggtggac ggcccccttc 480
 caacgaatcg tatatactaa catgcgcgcg cttectatat acacatatac atatatatat 540
 atatatatat gtgtgcgtgt atgtgtacac ctgtatttaa tttccttact cgcggggttt 600
 tctttttctt caattcttgg cttectcttt ctcgagtata taatttttca ggtaaaattt 660
 agtacgatag taaaatactt ctggaactcg tcacatatac gtgtacataa tgtctgaacc 720
 agctcaaaag aaacaaaagg ttgctaaca ctctctaga 759

<210> 53
 <211> 643
 <212> DNA
 <213> 啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
 <400> 53
 gaaatgaata acaatactga cagtactaaa taattgccta cttggcttca catacgttgc 60
 atacgtcgat atagataata atgataatga cagcaggatt atcgtaatac gtaatagttg 120
 aaaatctcaa aaatgtgtgg gtcatlacgt aaataatgat aggaatggga ttcttctatt 180
 tttctttttt ccattctagc agccgtcggg aaaacgtggc atctctctct tcgggctcaa 240
 ttggagtcac gctgccgtga gcatectctc tttccatata taacaactga gcacgtaacc 300
 aatggaaaag catgagctta gcgttgctcc aaaaaagtat tggatggta ataccatttg 360
 tctgttctct tctgactttg actcctcaaa aaaaaaaaat ctacaatcaa cagatcgctt 420
 caattacgcc ctcacaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa ttttatccct 480
 catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga cataatactt 540
 ctctatcaat ttcagttatt gttcttctct gcgttattct tctgttcttc tttttctttt 600
 gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaactc aga 643

<210> 54
 <211> 270
 <212> DNA
 <213> 啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
 <400> 54

[0052]

gacctcgagt catgtaatta gttatgtcac gcttacattc acgcectccc cccacatccg	60
ctctaaccga aaaggaagga gttagacaac ctgaagtcta ggtccctatt tattttttta	120
tagttatggt agtattaaga acgttattta tatttcaaat tttctttttt ttctgtaca	180
gacgcgtgta cgcattgtaac attatactga aaaccttget tgagaagggt ttgggacgct	240
cgaaggcttt aatttgcggc cggtagccaa	270

<210> 55
 <211> 15539
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 构建的质粒

<400> 55	
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgetagga gtcactgcca ggtatcggtt	240
gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta	300
ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat	360
tttttttttt ccacctagcg gatgactctt tttttttctt agcattgggc attatccat	420
aatgaattat acattatata aagtaatgtg atttcttcga agaataact aaaaaatgag	480
caggcaagat aaacgaaggc aaagatgaca gagcagaaag ccctagtaaa gcgtattaca	540
aatgaaacca agattcagat tgcgatctct ttaaagggtg gtcccctagc gatagagcac	600
tcgatcttcc cagaaaaaga ggcagaagca gtacgagaac aggccacaca atcgcaagtg	660
attaacgtcc acacagggtat agggtttctg gaccatatga tacatgctct ggccaagcat	720
tcgggtggt cgctaategt tgagtgcatt ggtgacttac acatagacga ccatcacacc	780
actgaagact gcgggattgc tctcggtcaa gcttttaaag aggccctagg ggccgtgcgt	840
ggagtaaaaa ggtttggatc aggatttgcg cctttggatg aggcactttc cagagcgggtg	900
gtagatcttt cgaacaggcc gtacgcagtt gtcgaacttg gtttgcaaag ggagaaagta	960
ggagatctct cttgcgagat gatcccgcat tttcttgaaa gctttgcaga ggctagcaga	1020
attacctcc acgttgattg tctgcgagcg aagaatgac atcacctag tgagagtgcg	1080
ttcaaggctc ttgcggttgc cataagagaa gccacctcgc ccaatggtag caacgatgtt	1140
ccctccacca aaggtgttct tatgtagtga caccgattat ttaaagctgc agcatacgat	1200
atatatacat gtgtatatat gtatacctat gaatgtcagt aagtatgtat acgaacagta	1260
tgatactgaa gatgacaagg taatgcatca ttctatacgt gtcattctga acgagcgcg	1320
ctttcctttt ttctttttgc tttttctttt tttttctctt gaactcgacg gatctatgcg	1380

[0053]

gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggaaat tgtaagcggtt	1440
aatatatttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gtcattttt taaccaatag	1500
gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtggt	1560
gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga	1620
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacctat caccctaate aagttttttg	1680
gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccetaaag ggagcccccg atttagagct	1740
tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaaagcga aggagcgggc	1800
gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt	1860
aatgcgcgcg tacagggcgc gtccattcgc cattcaggtt gcgcaactgt tgggaagggc	1920
gcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga	1980
ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagttag	2040
cgcgcgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgac	2100
ggcgcgccac tggtagagag cgactttgta tgccccaatt gcgaaacccg cgatatcctt	2160
ctcgattctt tagtaccgca ccaggacaag gaaaaggagg tcgaaacgtt tttgaagaaa	2220
caagaggaac tacacggaag ctctaaagat ggcaaccagc cagaaactaa gaaaatgaag	2280
ttgatggatc caactggcac cgctggcttg aacaacaata ccagccttc aacttctgta	2340
aataacggcg gtacgccagt gccaccagta ccgttacctt tcggtatacc tctttcccc	2400
atgtttccaa tgcccttcac gcctccaacg gctactatca caaatcctca tcaagctgac	2460
gcaagcccta agaaatgaat aacaatactg acagtactaa ataattgcct acttggttc	2520
acatacgttg catacgtcga tatagataat aatgataatg acagcaggat tatcgtata	2580
cgtaatagct gaaaatctca aaaatgtgtg ggtcattacg taaataatga taggaatggg	2640
attcttctat ttttctttt tccattctag cagccgtcgg gaaaacgtgg catcctctct	2700
ttcgggctca attggagtca cgctgcgtg agcatcctct ctttccatat ctaacaactg	2760
agcacgtaac caatggaaaa gcatgagctt agcgttgctc caaaaaagta ttggatgggt	2820
aataccattt gtctgttctc ttctgacttt gactcctcaa aaaaaaaaaat ctacaatcaa	2880
cagatcgctt caattacgcc ctacaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa	2940
ttttatccct catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga	3000
cataatactt ctctatcaat ttcagttatt gttcttctt gcgttattct tctgttcttc	3060
tttttcttt gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaacta gtatgactga	3120
caaaaaaact cttaaagact taagaaatcg tagttctgtt tacgattcaa tggttaaatc	3180
acctaategt gctatgttgc gtgcaactgg tatgcaagat gaagactttg aaaaacctat	3240
cgtcgggtgc atttcaactt gggtgaaaa cacacctgtt aatatccact tacatgactt	3300
tggtaaaact gccaaagtcg gtgttaagga agctggtgct tggccagttc agttcggaac	3360

[0054]

aatcacggtt tctgatggaa tgcceatggg aaccecaagga atgcgtttct ccttgacatc	3420
tcgtgatatt attgcagatt ctattgaagc agccatggga ggtcataatg cggatgcttt	3480
tgtagecatt ggcggttgatg ataaaaacat gcccggttct gttatcgcta tggctaacat	3540
ggatatccca gccatttttg cttacggcgg aacaattgca cctggtaatt tagacggcaa	3600
agatatcgat ttagtctctg tctttgaagg tgcggccat tggaaccacg gcgatatgac	3660
caaagaagaa gttaaagctt tggaatgtaa tgcttgctcc ggtcctggag gctgcggtgg	3720
tatgtatact gctaacacaa tggcgacagc tattgaagtt ttgggactta gccttcggg	3780
ttcatcttct caccggctg aatccgcaga aaagaaagca gatattgaag aagctggctg	3840
cgtgttgctc aaaatgctcg aaatgggctt aaaaccttct gacattttaa cgcgtgaagc	3900
ttttgaagat gctattactg taactatggc tctgggaggt tcaaccaact caaccttca	3960
cctcttagct attgcccag ctgctaattg ggaattgaca cttgatgatt tcaatacttt	4020
ccaagaaaaa gttcctcatt tggtgattt gaaaccttct ggtcaatatg tattccaaga	4080
cctttacaag gtcggagggg taccagcagt tatgaaatat ctccttaaaa atggcttct	4140
tcattggtgac cgtatcactt gtactggcaa aacagtcgct gaaaatttga aggcttttga	4200
tgatttaaca cctgggtcaaa aggttattat gccgcttgaa aatcctaaac gtgaagatgg	4260
tccgctcatt attctccatg gtaacttggc tccagacggt gccgttgcca aagtttctgg	4320
tgtaaaagtg cgtcgtcatg tcggtcctgc taaggctctt aattctgaag aagaagccat	4380
tgaagctgtc ttgaatgatg atattgttga tggatgatgtt gttgtcgtac gttttgtagg	4440
accaaagggc ggtcctggta tgcctgaaat gctttccctt tcatcaatga ttgttggtaa	4500
agggcaaggt gaaaaagttg cccttctgac agatggccgc ttctcagggtg gtacttatgg	4560
tcttgctgtg ggtcatatcg ctctgaagc acaagatggc ggtccaatcg cctacctgca	4620
aacaggagac atagtcacta ttgaccaaga cactaaggaa ttacactttg atatctccga	4680
tgaagagtta aaacatcgct aagagaccat tgaattgcca ccgctctatt cacgcggtat	4740
ccttggtaaa tatgctcaca tcgtttcgtc tgcttctagg ggagccgtaa cagacttttg	4800
gaagcctgaa gaaactggca aaaaatgttg tctggttgc tgtggttaag cggccgcgtt	4860
aattcaaat attgatata gttttttaat gagtattgaa tctgtttaga aataatggaa	4920
tattattttt atttatttat ttatattatt ggtcggctct tttcttctga aggtcaatga	4980
caaatgata tgaaggaaat aatgatttct aaaattttac aacgtaagat atttttaca	5040
aagcctagct catcttttgt catgcactat ttactcacg cttgaaatta acggccagtc	5100
cactgcggag tcatttcaaa gtcattcctaa tcgatctatc gtttttgata gctcattttg	5160
gagttcgcga ttgtctctg ttattcacia ctgttttaat ttttatttca ttctggaact	5220
cttcgagttc ttgttaaagt ctctcatagt agcttacttt atcctccaac atatttaact	5280
tcatgtcaat ttcggtctt aaattttcca catcatcaag ttcaacatca tcttttaact	5340

[0055]

tgaatttatt ctctagctct tccaaccaag cctcattgct cettgattta ctggtgaaaa	5400
gtgatacact ttgcgcgcaa tccagggtcaa aactttcctg caaagaattc accaatattct	5460
cgacatcata gtacaatttg ttttgttctc ccatcacaat ttaatatacc tgatggattc	5520
ttatgaagcg ctgggtaatg gacgtgtcac tctacttgcg ctttttccct actcctttta	5580
gtacggaaga caatgctaataaataagagg gtaataataa tattattaat cggcaaaaaa	5640
gattaaacgc caagcgttta attatcagaa agcaaacgtc gtaccaatcc ttgaatgctt	5700
cccaattgta tattaagagt catcacagca acatattctt gttattaaat taattattat	5760
tgatttttga tattgtataa aaaaaccaa tatgtataaa aaaagtgaat aaaaaatacc	5820
aagtatggag aaatatatta gaagtctata cgttaaacca cccgggcccc cctcggaggt	5880
cgacggtatc gataagcttg atatcgaatt cctgcagccc gggggatcca ctagtctag	5940
agcgccgct ctagaactag taccacaggt gttgtcctct gaggacataa aatacacacc	6000
gagattcatc aactcattgc tggagttagc atatctacaa ttgggtgaaa tggggagcga	6060
tttgcaggca tttgctcggc atgccggtag aggtgtggtc aataagagcg acctcatgct	6120
atacctgaga aagcaacctg acctacagga aagagttact caagaataag aattttcggt	6180
ttaaaacctc agagtcactt taaaatttgt atacacttat tttttttata acttatttta	6240
taataaaaaat cataaatcat aagaaattcg ctactctta attaataaaa aagttaaaat	6300
tgtacgaata gattcaccac ttcttaacaa atcaaaccct tcattgattt tctcgaatgg	6360
caatacatgt gtaattaaag gatcaagagc aaacttcttc gccataaagt cggcaacaag	6420
ttttggaaca ctactcctgc tcttaaaacc gccaaatata gctcccttc atgtacgacc	6480
gcttagcaac agcataggat tcatcgacaa attttgtgaa tcaggaggaa cacctacgat	6540
cacactgact ccatatgcct cttgacagca ggacaacgca gttaccatag tatcaagacg	6600
gcctataact tcaaaagaga aatcaactcc accgtttgac atttcagtaa ggacttcttg	6660
tattggtttc ttataatctt gagggttaac acattcagta gccccgacct ccttagcttt	6720
tgcaaatgtg tccttattga tgtctacacc tataatcctc gctgcgcctg cagctttaca	6780
ccccataata acgcttagtc ctactcctcc taaaccgaat actgcacaag tcgaacctg	6840
tgtaaccttt gcaactttta ctgcggaacc gtaaccggtg gaaaatccgc accctatcaa	6900
gcaaaccttt tccagtgttg aagctgcacg gatttttagcg acagatatct cgtccaccac	6960
tgtgtatttg gaaaatgtag aagtaccaag gaaatggtgt ataggtttcc ctctgcatgt	7020
aaatctgctt gtaccatcct gcatagtacc tctaggcata gacaaatcat ttttaaggca	7080
gaaattaccc tcaggatggt tgcagactct acacttacca cattgaggag tgaacagtgg	7140
gatcacttta tcaccaggac gaacagtggg aacaccttca cctatggatt caacgattec	7200
ggcagcctcg tgtcccgca ttactggcaa aggagtaact agagtgccac tcaccacatg	7260
gtcgtcggat ctacagattc cgggtggcaac catcttgatt ctaacctcgt gtgcttttgg	7320

[0056]

tggcgctact tctacttctt ctatgctaaa cggtcttttc tcttcccaca aaactgccgc	7380
tttacactta ataactttac cggctgttga catcctcagc tagctattgt aatatgtgtg	7440
tttgtttgga ttattaagaa gaataattac aaaaaaatt acaaaggaag gtaattacaa	7500
cagaattaag aaaggacaag aaggaggaag agaatcagtt cattatttct tctttgttat	7560
ataacaaacc caagtagcga tttggccata cattaaaagt tgagaaccac cctccctggc	7620
aacagccaca actcgttacc attgttcac acgatcatga aactcgtgt cagctgaaat	7680
ttcacctcag tggatctctc tttttattct tcatcgttcc actaaccttt tccatcagc	7740
tggcagggaa cggaaagtgg aatcccattt agcagcttc ctcttttctt caagaaaaga	7800
cgaagcttgt gtgtgggtgc gcgcgctagt atctttccac attaagaaat ataccataaa	7860
ggttacttag acatcactat ggctatatat atatatatat atatatgtaa cttagcacca	7920
tcgcgcgtgc atcactgcat gtgttaaccg aaaagtttgg cgaacacttc accgacacgg	7980
tcatttagat ctgtcgtctg cattgcacgt cccttagcct taaatcctag gcgggagcat	8040
tctcgtgtaa ttgtgcagcc tgcgtagcaa ctcaacatag cgtagtctac ccagtttttc	8100
aagggtttat cgttagaaga ttctcccttt tcttctgtct cacaatctt aaagtcatac	8160
attgcacgac taaatgcaag catgcggtac ccccggtctg caggaattcg atatcaagct	8220
tatcgatacc gtgcactggc cattaatctt tcccatatta gatttcgcca agccatgaaa	8280
gttcaagaaa ggtctttaga cgaattaccc ttcatttctc aaactggcgt caagggatcc	8340
tggtatgggt ttatcgtttt atttctgggt cttatagcat cgttttggac ttctctgttc	8400
ccattagcgc gttcaggagc cagcgcagaa tcattctttg aaggatactt atcctttcca	8460
atthtgattg tctgttacgt tggacataaa ctgtatacta gaaattggac tttgatgggtg	8520
aaactagaag atatggatct tgataccggc agaaaacaag tagatttgac tcttcgtagg	8580
gaagaaatga ggattgagcg agaaacatta gcaaaaagat ccttcgtaac aagattttta	8640
cattttcgtt gttgaaggga aagatatgag ctatacagcg gaatttccat atcactcaga	8700
ttttgttata taattttttc ctcccacgt ccgcgggaat ctgtgtatat tactgcatct	8760
agatatatgt tatcttatct tggcgcgtac atttaatttt caacgtattc tataagaaat	8820
tgcgggagtt ttttcatgt agatgatact gactgcacgc aaatatagge atgatttata	8880
ggcatgattt gatggctgta ccgataggaa cgctaagagt aacttcagaa tcgttatcct	8940
ggcggaaaaa attcatttgt aaactttaaa aaaaaagcc aatatcccca aaattattaa	9000
gagcgccctc attattaact aaaatttcac tcagcatcca caatgtatca ggtatctact	9060
acagatatata catgtggcga aaaagacaag aacaatgcaa tagcgcatca agaaaaaca	9120
caaagcttcc aatcaatgaa tcgaaaatgt cattaaaata gtatataaat tgaaactaag	9180
tcataaagct ataaaaagaa aatttattta aatgcaagat ttaaagtaaa ttacggcccc	9240
tgcaggcctc agctcttggt ttgtcttgca aataacttac ccattttttt caaaacttta	9300

[0057]

ggtgcaccct cctttgctag aataagttct atccaataca tectatttgg atctgcttga	9360
gcttctttca tcacggatac gaattcattt tctgttctca caattttgga cacaactctg	9420
tcttcggttg ccccgaaact ttctggcagt tttagtaat tccacatagg aatgtcatta	9480
taactctgggt teggaccatg aatttccttc tcaaccgtgt aaccatcggt attaatgata	9540
aagcagattg ggtttatctt ctctctaata gctagtccta attcttggac agtcagttgc	9600
aatgatccat ctccgataaa caataaatgt ctagattctt tatctgcaat ttggctgcct	9660
agagctgcgg ggaaagtgtg tcctatagat ccccaacaagg gttgaccaat aaaatgtgat	9720
ttcgatttca gaaatataga tgaggcaccg aagaaagaag tgccttggtc agccacgac	9780
gtctcattac tttgggtcaa attttcgaca gcttgccaca gtctatcttg tgacaacagc	9840
gcgttagaag gtacaaaatc ttcttgcttt ttatctatgt acttgccctt atattcaatt	9900
tcggacaagt caagaagaga tgatatcagg gattcgaagt cgaaattttg gattctttcg	9960
ttgaaaattt taccttcacg gatattcaag gaaatcattt tattttcatt aagatgggtga	10020
gtaaattgcac cgtactaga atcggttaagc ttacaccca acataagaat aaaatcagca	10080
gattccacaa attccttcaa gtttggtctt gacagagtac cgttgtaaat ccccaaaaat	10140
gagggcaatg ctcatcaac agatgattta ccaaagtcca aagtagtaat aggtaactta	10200
gtctttgaaa taaactgagt aacagtcttc tctagggcga acgatataat ttcatggcct	10260
gtgattacaa ttggtttctt ggcaattctc agactttcct gtattttgtt cagaatctct	10320
tgatcagatg tattecgact ggaattttcc ttcttaagag gcaaggatgg ttttcagcc	10380
ttagcggcag ctacatctac aggtaaattg atgtaaaccg gctttcttcc ctttagtaag	10440
gcagacaaca ctctatcaat ttcaacagtt gcattctcgg ctgtcaataa agtcctggca	10500
gcagtaaccg gttegtgcat ctccataaag tgcttgaaat caccatcagc caacgtatgg	10560
tgaacaaact taccttcgtt ctgcacttcc gaggtaggag atcccacgat ctcaacaaca	10620
ggcaggttct cagcatagga gcccgttaag ccattaactg cggataatcc gccaacacca	10680
aatgtagtca agaatgccgc agcctttttc gttcttgctg acccgtcggc catataggag	10740
gcattttaact cattagcatt tcccacccat ttcatatctt tgtgtgaaat aatttgatct	10800
agaaattgca aattgtagtc acctggtaact ccgaatattt cttctatacc taattcgtgt	10860
aatctgtcca acagatagtc acctactgta tacattttgt ttactagttt atgtgtgttt	10920
attcgaaact aagttcttgg tgttttaaaa ctaaaaaaaa gactaactat aaaagtagaa	10980
tttaagaagt ttaagaaata gatttacaga attacaatca atacctaccg tctttatata	11040
cttattagtc aagtagggga ataatttcag ggaactgggt tcaacctttt ttttcagctt	11100
tttccaaaac agagagagca gaaggtaata gaagggtgaa gaaaatgaga tagatacatg	11160
cgtgggtcaa ttgccttggt tcatcattta ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg	11220
ttgtgcccgt tttttgctg tttgtgcccc tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga	11280

[0058]

cctatgaact gatggttggg gaagaaaaca atatitttggg gctgggattc tttttttttc	11340
tggatgccag cttaaaaagc gggctccatt atatittagtg gatgccagga ataaactggt	11400
caccagaca cctacgatgt tatatattct gtgtaaccgc cccctattt tgggcatgta	11460
cgggttacag cagaattaaa aggcataatt tttgactaaa taaagttagg aaaatcacta	11520
ctattaatta tttacgtatt ctttgaaatg gcagtattga taatgataaa ctggaactga	11580
aaaagcgtgt tttttattca aaatgattct aactccctta cgtaatcaag gaatcttttt	11640
gccttggcct ccgcgtcatt aaacttcttg ttgttgacgc taacattcaa cgctagtata	11700
tattcgtttt tttcaggtaa gttcttttca acgggtctta ctgatgaggc agtcgcgtct	11760
gaacctgtta agaggtaaaa tatgtcttct tgaccgtacg tgtcttgcat gttattagct	11820
ttgggaattt gcatcaagtc ataggaaaat ttaaactcttg gctctcttgg gctcaagggtg	11880
acaaggctct cgaataatagg gcgcgcccc cgcgggtgga gctccagctt ttgttccctt	11940
tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatggctcat agctgtttcc tgtgtgaaat	12000
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg	12060
ggtgcctaat gaggtagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag	12120
tcgggaacc tgctgtgcca gctgcattaa tgaatcgccc aacgcgcggg gagaggcggt	12180
ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc ggctcgttcg	12240
ctgcggcgag cgggtatcagc tcaactcaag gcggtataac ggttatccac agaactcagg	12300
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag	12360
gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga	12420
cgtcaagtc agagggtggc aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct	12480
ggaagctccc tcgtgcgctc tectgttccg acctgcgcg ttaccggata cctgtccgcc	12540
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg	12600
gtgtaggtcg ttcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc	12660
tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca	12720
ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgcacagag	12780
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgt	12840
ctgtgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	12900
accgctggta gcggtggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga	12960
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca	13020
cgtaaggga ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat	13080
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac	13140
caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt	13200
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt	13260

[0059]

gttgcaatga taccgagaga cccacgctca cgggtccag atttatcage aataaaccag	13320
ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt taccgcctc catccagtct	13380
attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt	13440
gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtc cgtcgtcgt ttggtatggc ttcattcage	13500
tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgttgtgcaa aaaagcgggt	13560
agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg	13620
gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg	13680
actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgt tgcggcgacc gagttgtctt	13740
tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgcctac	13800
attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt	13860
tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt	13920
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg	13980
aaatgttgaa tactcact ctctctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat	14040
tgctcatga gggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg	14100
cgacatttc cccgaaaagt gccacctgaa cgaagcatct gtgcttcatt ttgtagaaca	14160
aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca aacaaagaat ctgagctgca tttttacaga	14220
acagaaatgc aacgcgaaag cgtattttta ccaacgaaga atctgtgctt catttttgta	14280
aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt tttcaacaa agaactctgag ctgcattttt	14340
acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta ttttaccac aaagaatcta tacttctttt	14400
ttgtctaca aaaatgcac ccgagagcgc ttttttcta acaaagcatc ttagattact	14460
ttttttctcc tttgtgcgt ctataatgca gtctcttgat aactttttgc actgtaggtc	14520
cgttaagggt agaagaaggc tactttgtg tctattttct ctccataaa aaaagcctga	14580
ctccacttcc cgcgtttact gattactagc gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa	14640
ggcaccctcg atttatctct ataccgatgt ggattgcgca tacttttgta acagaaagtg	14700
atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa aattatgaac ggtttcttct attttgtctc	14760
tatatactac gtataggaaa tgtttacatt ttcgtattgt tttegattca ctctatgaat	14820
agttcttact acaatttttt tgtctaaaga gtaatactag agataaacat aaaaaatgta	14880
gaggtegagt ttagatgcaa gttcaaggag cgaaagggtg atgggtagggt tatataggga	14940
tatagcacag agatatatag caaagagata cttttgagca atgtttgtgg aagcgggtatt	15000
cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg gtgcgttttt gggtttttga aagtgcgtct	15060
tcagagcgct tttggttttc aaaagcgctc tgaagtccct atactttcta gagaatagga	15120
acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc gaaaacgagc gcttcgaaa atgcaacgcg	15180
agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt cgcacctata tctgcgtgtt gcctgtatat	15240

[0060]

atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg tgttttatgct taaatgcgta cttatatgcg	15300
tctattttatg taggatgaaa ggtagtctag tacctcctgt gatattatcc cattccatgc	15360
gggggtatcgt atgcttcctt cagcactacc ctttagctgt tctatatgct gccactcctc	15420
aattggatta gtctcatcct tcaatgctat catttccttt gatattggat catactaaga	15480
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtc	15539

<210> 56

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 经密码子优化适于在啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达的马ADH编码区

<400> 56

atgtcaacag ccggtaaagt tattaagtgt aaagcggcag ttttgtggga agagaaaaag	60
ccgttttagca tagaagaagt agaagtagcg ccacaaaaag cacacgaggt tagaatcaag	120
atggttgcca ccggaatctg tagatccgac gaccatgtgg tgagtggcac tctagttact	180
cctttgccag taatcgcgga acacgagget gccggaatcg ttgaatccat aggtgaaggt	240
gttaccactg ttcgtcctgg tgataaagt atccactgt tcactcctca atgtggtaag	300
tgtagagtct gcaaaccatc tgagggtaat ttctgcctta aaaatgattt gtctatgcct	360
agaggtaacta tgcaggatgg tacaagcaga ttacatgca gagggaaacc tataccat	420
ttccttggtta cttctacatt ttcccaatac acagtgggtg acgagatata tgctcgctaaa	480
atcgatgcag cttcaccact ggaaaaagtt tgcttgatag ggtgcggatt ttccaccggt	540
tacggttccg cagttaaagt tgcaaagggt acacagggtt cgacttgtgc agtattcggt	600
ttaggaggag taggactaag cgttattatg ggggtgtaaag ctgcaggcgc agcgaggatt	660
ataggtgtag acatcaataa ggacaaattt gcaaaagcta aggaggtcgg ggctactgaa	720
tgtgttaacc ctcaagatta taagaaacca atacaagaag tccttactga aatgtcaaac	780
ggtggagttg atttctcttt tgaagttata ggccgtcttg atactatggt aactgcgttg	840
tcctgctgtc aagaggcata tggagtcagt gtgatcgtag gtgttcctcc tgattcacia	900
aatttgcga tgaatcctat gctgttgcta agcggtcgta catggaaggg agctatattt	960
ggcggtttta agagcaagga tagtgttcca aaacttggtt ccgactttat ggcaagaag	1020
tttgcctctg atcctttaat tacacatgta ttgccattcg agaaaatcaa tgaagggttt	1080
gatttgtaa gaagtgggtga atctattcgt acaattttaa ctttt	1125

<210> 57

<211> 375

<212> PRT

<213> 马 (*Equus caballus*)

<400> 57

[0061]

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

[0062]

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

<210> 58

<211> 9089

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建的质粒

<400> 58

```

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca      60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg      120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc      180
accataccac agcttttcaa ttcaattcat cttttttttt ttattctttt ttttgatttc      240
ggtttctttg aaattttttt gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg      300
agcacagact tagattggtg tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaaca tgaaattgcc      360
cagtattctt aaccaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt      420
cgaaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag tctgtttgct gccaaagctat      480
ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact tgtgtgcttc attggatggt cgtaccacca      540
aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaat ttgtttacta aaaacacatg      600
tggtatctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg      660
ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca gaaaatttgc tgacattggt aatacagtca      720
aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac      780
acgggtgtgtt gggcccaggt attgttagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa      840

```

[0063]

aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg caagggetcc ctatctactg	900
gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcggt	960
ttattgctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggta cgattggttg attatgacac	1020
ccggtgtggg tttagatgac aaggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg	1080
atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttggaag aggactatth gcaaaggga	1140
gggatgctaa ggtagagggt gaacgttaca gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa	1200
gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcatgtata ctaaaactcac	1260
aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt tattacceta tgcggtgtga aataccgcac	1320
agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaaa cgtaataatt ttgttaaaat	1380
tcgctttaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa	1440
tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttgaaca	1500
agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg	1560
gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta	1620
aagcaactaa tcggaaccct aaaggagacc ccgatttag agcttgacgg ggaagccgg	1680
cgaacgtggc gaaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa	1740
gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg	1800
gcgctgcgc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg	1860
cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg	1920
taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaacgac ggccagttag ccgcgtaat	1980
acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggccccccct cgaggctgac tggccattaa	2040
tctttcccat attagatttc gccaaagccat gaaagttcaa gaaaggtctt tagacgaatt	2100
acccttcatt tctcaaactg gcgtcaagg atcctgggtat ggttttatcg ttttattct	2160
ggttcttata gcatcgtttt ggacttctct gtcccatata ggcggttcag gagccagcgc	2220
agaatcattc tttgaaggat acttatcctt tccaattttg attgtctgtt acgttgaca	2280
taaaactgtat actagaaatt ggactttgat ggtgaaacta gaagatatgg atcttgatac	2340
cggcagaaaa caagtagatt tgactcttcg tagggaagaa atgaggattg agcgagaaac	2400
attagcaaaa agatccttcg taacaagatt ttacatttc tgggtgtgaa gggaaagata	2460
tgagctatac agcggaattt ccatatcact cagattttgt tatctaattt tttcctccc	2520
acgtccgagg gaatctgtgt atattactgc atctagatat atgttatctt atcttggcgc	2580
gtacatttaa ttttcaacgt attctataag aaattgcggg agtttttttc atgtagatga	2640
tactgactgc acgcaaatat aggcattgatt tataggcatg atttgatggc tgtaccgata	2700
ggaacgctaa gagtaacttc agaatcgta tctggcgga aaaaattcat ttgtaaactt	2760
taaaaaaaaa agccaatatc cccaaaatta ttaagagcgc ctccattatt aactaaaatt	2820

[0064]

tcactcagca tccacaatgt atcaggtatc tactacagat attacatgtg gcgaaaaaga	2880
caagaacaat gcaatagegc atcaagaaaa aacacaaagc titcaatcaa tgaatcgaaa	2940
atgtcattaa aatagtatat aaattgaaac taagtcataa agctataaaa agaaaattta	3000
tttaaatgca agatttaaag taaattcacg gccctgcagg ccctaacctg ctaggacaca	3060
acgtctttgc ctggtaaagt ttctagctga cgtgattcct tcacctgtgg atccggcaat	3120
tgtaaagggt gtgaaacct cagcttcata accgacacct gcaaatgact ttgcattctt	3180
aacaaagata gttgtatcaa tticacgttc gaatctatta aggttatcga tgttcttaga	3240
ataaatgtag gcggaatgtt ttctattctg ctacagctatc ttggcgtatt taatggcttc	3300
atcaatgtcc ttcactctaa ctataggcaa aattggcatc atcaactccg tcataacgaa	3360
eggatgggtt gcgttgactt cacaaataat acactttaca ttacttggtg actctacatc	3420
tatttcatcc aaaaacagtt tagcgtcctt accaaccac ttcttattaa tgaaatattc	3480
ttgagtttca ttgttctttt gaagaacaag gtctatcagc ttggatactt ggtcttcatt	3540
gataatgacg gcgttggttt tcaacatgtt agagatcaga tcactctcaa cgttttcaaa	3600
cacgaacact tctttttccg cgatacaagg aagattgttg tcaaacgaac aaccttcaat	3660
aatgcttctg ccggccttct cgatatctgc tgtatcgtct acaataaccg gaggattacc	3720
cgcgccagct ccgatggcct ttttaccaga attaagaagg gtttttacca taccggggcc	3780
acctgtaccg cacaacaatt ttatggatgg atgtttgata atagcgtcta aactttccat	3840
agttgggttc tttatagtag tgacaagggt ttcagggtcca ccacagctaa ttatggcttt	3900
gtttatcatt tctactgca aagcgacaca ctttttggcg catgggtgac cattaaatac	3960
aactgcattc ccgcagcta tcatacctat agaattgcag ataacggttt ctgttggtt	4020
cgtgcttgga gttatagegc cgataactcc gtatggactc atttcaacca ctgttagtcc	4080
attatcgccg gaccatgctg ttgttgtcag atcttcagt cctgggggtat acttggccac	4140
taattcatgt ttcaagattt tatectcata ccttcccatg tgggtttcct ccaggatcat	4200
tgtggctaag acctctttat tctgtaatgc ggcttttctt atttcgggtga ttattttctc	4260
tctttgttcc tttgtgtagt gtagggaaag aatcttttgt gcatgtactg cagaagaaat	4320
ggcattctca acattttcaa atactccaaa acatgaagag ttatctttgt aattctttaa	4380
gttgatgttt tcaccattag tcttcacttt caagtctttg gtggttgga ttaaggtatc	4440
tttatccatg gtgtttgttt atgtgtgttt attcgaaact aagttcttgg tgttttaaaa	4500
ctaaaaaaaa gactaactat aaaagtagaa tttaagaagt ttaagaaata gatttacaga	4560
attacaatca atacctaccg tctttatata cttattagtc aagtagggga ataatttcag	4620
ggaactggtt tcaacctttt ttttcagctt ttccaaatc agagagagca gaaggtaata	4680
gaagggtgaa gaaaatgaga tagatacatg cgtgggtcaa ttgccttggt tcacatitta	4740
ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg ttgtgcccg tttttgcctg tttgtgcccc	4800

[0065]

tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga cctatgaact gatggttggt gaagaaaaca	4860
atatttttgggt gctgggattc tttttttttc tggatgccag cttaaaaagc gggctccatt	4920
atatttagtg gatgccagga ataaactgtt caccagaca cctacgatgt tatatattct	4980
gtgtaaccgg cccctattt tgggcatgta cgggttacag cagaattaaa aggctaattt	5040
tttgactaaa taaagttagg aaaatcacta ctattaatta ttacgtatt ctttgaaatg	5100
gcagtattga taatgataaa ctgaaactga aaaagcgtgt tttttattca aaatgattct	5160
aactccctta cgtaatcaag gaatcttttt gccttggcct ccgcgtcatt aaacttcttg	5220
ttgttgacgc taacattcaa cgctagtata tattcgtttt tttcaggtaa gttcttttca	5280
acgggtctta ctgatgaggc agtcgcgtct gaacctgtta agaggtaaaa tatgtcttct	5340
tgaccgtacg tgtcttgcat gttattagct ttgggaattt gcatcaagtc ataggaaaat	5400
ttaaatcttg gctctcttgg gctcaagggt acaaggctct cgaaaatagg gcgcgcccc	5460
ccgcgggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa	5520
tcattggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattcc acacaacata	5580
ggagccggaa gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaata gagtgaggta actcacatta	5640
attgcgttgc gctcactgcc cgttttccag tcgggaaacc tgcctgtcca gctgcattaa	5700
tgaatcgccc aacgcgcggg gagagcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgttctctcg	5760
ctcactgact cgtcgcgtc ggctgttcgg ctgcggcgag cgggtatcagc tcaactcaag	5820
gcggtaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5880
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	5940
cgtccccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agagggtggcg aaaccgaca	6000
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgtc tctgttccg	6060
acctgcgcg ttaccggata cctgtccgcc ttttccctt cgggaagcgt ggcgctttct	6120
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgtccaa gctgggctgt	6180
gtgcacgaac ccccggttca gcccagcgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag	6240
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	6300
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6360
actagaagga cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6420
gttggttagct cttgatecgg caaacaacc accgctggta ggggtggtt tttgtttgc	6480
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	6540
gggtctgacg ctcaaggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat gagattalca	6600
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	6660
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca	6720
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg	6780

[0066]

atacgggagg gcttaccatc tggecccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca	6840
ccggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg	6900
cctgcaactt tatccgctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt	6960
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca	7020
cgctcgctgt ttggtatggc ttcatccagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca	7080
tgatcccca tgttgtgcaa aaaagegggt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga	7140
agtaagttag ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact	7200
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga	7260
gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgeccggcgt caatacggga taataccgcg	7320
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc	7380
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga	7440
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat	7500
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt	7560
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt	7620
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa	7680
cgaagcatct gtgcttcatt ttgtagaaca aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca	7740
aacaagaat ctgagctgca tttttacaga acagaaatgc aacgcgaaag cgctatttta	7800
ccaacgaaga atctgtgctt cttttttgta aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt	7860
tttcaaacia agaatctgag ctgcattttt acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta	7920
ttttaccaac aaagaatcta tacttctttt ttgttctaca aaaatgcac ccgagagcgc	7980
tatttttcta acaaagcatc ttagattact tttttctccc tttgtgcgct ctataatgca	8040
gtctcttgat aactttttgc actgtaggtc cgtaagggtt agaagaaggc tactttggtg	8100
tctattttct cttccataaa aaaagcctga ctccacttcc cgcgtttact gattactage	8160
gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa ggcatccccg atttatattct ataccgatgt	8220
ggattgcgca tactttgtga acagaaagtg atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa	8280
aattatgaac ggtttcttct attttgtctc tatatactac gtataggaaa tgtttacatt	8340
ttcgtattgt ttgcatttca ctctatgaat agttcttact acaatttttt tgtctaaaga	8400
gtaatactag agataaacat aaaaaatgta gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag	8460
cgaagggtgg atgggtaggt tatataggga tatagcacag agatatatag caaagagata	8520
cttttgagca atgtttgtgg aagcggtaat cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg	8580
gtgcgttttt ggttttttga aagtgcgtct tcagagcgct tttggttttc aaaagcgtc	8640
tgaagtccct atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc	8700
gaaaacgagc gttccgaaa atgcaacgcg agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt	8760

[0067]

cgcacctata tctgcgtggt gcctgtatat atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg	8820
tgtttatgct taaatgcgta cttatatgcg tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag	8880
tacctcctgt gatattatcc cattccatgc ggggtatcgt atgcttcctt cagcactacc	8940
ctttagctgt tctatatgct gccactcctc aattggatta gtctcatcct tcaatgctat	9000
catttccttt gatattggat catactaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa	9060
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtc	9089

<210> 59

<211> 672

<212> DNA

<213> 啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 59

agttcgagtt tatcattatc aatactgcc a tttcaaagaa tacgtaaata attaatagta	60
gtgattttcc taactttatt tagtcaaaaa attagccttt taattctgct gtaaccgta	120
catgcccaaa atagggggcg ggttacacag aatatataac atcgtagggtg tctgggtgaa	180
cagtttatcc ctggcatcca ctaaataataa tggagcccg c tttttaagct ggcatccaga	240
aaaaaaaaga atcccagcac caaaatattg ttttcttcac caaccatcag ttcataggtc	300
cattctctta gcgcaactac agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc	360
tcaatggagt gatgcaacct gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gaccacgca	420
tgtatctatc lcattttctt acaccttcta ttacctctg ctctctctga tttggaaaaa	480
gctgaaaaaa aagggtgaaa ccagttccct gaaattatc ccctacttga ctaataagta	540
tataaagacg gtaggtattg attgtaattc tgtaaatcta tttcttaaac ttcttaaatt	600
ctacttttat agttagtctt ttttttagtt ttaaaacacc aagaacttag tttcgaataa	660
acacacataa ac	672

<210> 60

<211> 1023

<212> DNA

<213> 啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

<400> 60

caccgcggtg gggcgcgcc tattttcgag gacctgtca ccttgagccc aagagagcca	60
agatttaaat tttcctatga ctgatgcaa attcccaaag ctaataacat gcaagacag	120
tacggtcaag aagacatatt tgacctctta acaggttcag acgcgactgc ctcatcagta	180
agaccggttg aaaagaactt acctgaaaaa aacgaatata tactagcgtt gaatgttagc	240
gtcaacaaca agaagtttaa tgacgcggag gccaggcaa aaagattcct tgattacgta	300
agggagttag aatcattttg aataaaaaac acgctttttc agttcgagtt tatcattatc	360
aatactgcc a tttcaaagaa tacgtaaata attaatagta gtgattttcc taactttatt	420
tagtcaaaaa attagccttt taattctgct gtaaccgta catgcccaaa atagggggcg	480

[0068]

ggttacacag aatatataac atcgtaggtg tctgggtgaa cagtttattc ctggcatcca	540
ctaaatataa tggagcccg c tttttaagct ggcatccaga aaaaaaaga atcccagcac	600
caaaatattg ttttcttcac caaccatcag ttcataaggc cattctctta gcgcaactac	660
agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc tcaatggagt gatgcaacct	720
gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gacccacgca tgtatctatc tcattttctt	780
acaccttcta ttaccttctg ctctctctga tttggaaaaa gctgaaaaaa aaggttgaaa	840
ccagttccct gaaattattc ccctacttga ctaataagta tataaagacg gtaggtattg	900
attgtaattc tgtaaactca tttcttaaac ttcttaaatt ctacttttat agttagtctt	960
tttttttagtt ttaaacacc aagaacttag tttcgaataa acacacataa actagtaaac	1020
aaa	1023

<210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 61	
caaaagctga gctccaccgc g	21

<210> 62
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 62	
gtttactagt ttatgtgtgt ttattcgaaa ctaagttctt ggtg	44

<210> 63
 <211> 8994
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 构建的质粒

<400> 63	
ctagttctag agcgccgcc accgcggtgg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg	60
ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtea tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg	120
ctcacaattc cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa	180
tgagtgaggt aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca gtcgggaaac	240
ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt	300
gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga	360

[0069]

gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca	420
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg	480
ctggcggtttt tccatagget ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt	540
cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc	600
ctcgtgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccgat acctgtccgc ctttctccct	660
tccggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgcgttaggt atctcagttc ggtgtaggtc	720
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta	780
tccggttaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca	840
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag	900
tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag	960
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgtggt	1020
agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgc gaaaaaagg atctcaagaa	1080
gaccttttga tctttctac ggggtctgac gtcagtgga acgaaaactc acgttaaggg	1140
attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga	1200
agtttttaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta	1260
atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc	1320
cccgctgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgcgtcaatg	1380
ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga	1440
agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt	1500
tgcggggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaactg tgttgccatt	1560
gtacacggca tcgtgggtgc acgctcgctg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc	1620
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcgg tagctcctc	1680
ggctctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tactactcat gggtatggca	1740
gactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag	1800
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccgcg	1860
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgetcat cattggaaaa	1920
cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa	1980
cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga	2040
gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga	2100
atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg	2160
agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaac taggggttcc gcgcacattt	2220
ccccgaaaag tgccacctga acgaagcatc tgtgttcat tttgtagaac aaaaatgcaa	2280
cgcgagagcg ctaatttttc aaacaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg	2340

[0070]

caacgcgaaa gcgctatttt accaacgaag aatctgtgct tcatttttgt aaaacaaaa	2400
tgcaacgcga gagcgctaatt ttttcaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag	2460
aaatgcaacg cgagagcgct attttaccaa caaagaatct atacttcttt tttgttctac	2520
aaaaatgcat cccgagagcg ctatttttct aacaaagcat cttagattac ttttttctc	2580
ctttgtgcgc tctataatgc agtctcttga taactttttg cactgtaggt ccgttaaggt	2640
tagaagaagg ctacttttgt gtctattttc tcttccataa aaaaagcctg actccacttc	2700
ccgcgtttac tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa aggcatcccc	2760
gattatatct tataccgatg tggattgcgc atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg	2820
atgattcttc attggtcaga aaattatgaa cggtttcttc tattttgtct ctatatacta	2880
cgtataggaa atgtttacat tttcgtattg ttttcgattc actctatgaa tagttcttac	2940
tacaattttt ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt agaggtcgag	3000
tttagatgca agttcaagga gcgaaagggt gatgggtagg ttatataggg atatagcaca	3060
gagatatata gcaaagagat acttttgagc aatgtttgtg gaagcggat tcgcaatatt	3120
ttagtagctc gttacagtec ggtgcgtttt tggttttttg aaagtgcgtc ttcagagcgc	3180
ttttggtttt caaaagcgct ctgaagtcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa	3240
taggaacttc aaagcgtttc cgaaaacgag cgcttccgaa aatgcaacgc gagctgcgca	3300
catacagctc actgttcacg tcgcacctat atctgcgtgt tgccgtgata tatatataca	3360
tgagaagaac ggcatagtgc gtgtttatgc ttaaattgct acttatatgc gtctatttat	3420
gtaggatgaa aggtagtcta gtacctctg tgatattatc ccattccatg cggggtatcg	3480
tatgcttcct tcagcactac cctttagctg ttctatatgc tgccactcct caattggatt	3540
agtctcatcc ttcaatgcta tcatttcctt tgatattgga tcatactaag aaaccattat	3600
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccttttcgtc tcgcgcgttt	3660
cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca cagcttgtct	3720
gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg	3780
tcggggctgg cttaactatg cggcattcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatcga	3840
ctacgtcgta aggcggtttc tgacagagta aaattcttga gggaactttc accattatgg	3900
gaaatgcttc aagaaggatg tgacttaaac tccatcaaat ggtcagggtca ttgagtgttt	3960
tttatttgtt gtattttttt ttttttagag aaaatcctcc aatatcaaatt taggaatcgt	4020
agtttcatga ttttctgtta cacctaactt tttgtgtggt gccctcctcc ttgtcaatat	4080
taatgttaaa gtgcaattct ttttcttat cactgtgagc cattagtatc aatttgctta	4140
cctgtatttc tttactatcc tcctttttct ccttcttgat aaatgtatgt agattgcgta	4200
tatagtttcg tctacctat gaacatatcc cattttgtaa tttcgtgtcg tttctattat	4260
gaatttcatt tataaagttt atgtacaaat atcataaaaa aagagaatct ttttaagcaa	4320

[0071]

ggattttctt aactttctcg gcgacagcat caccgacttc ggtggtactg ttggaaccac	4380
ctaaateacc agttctgata cctgcateca aaaccttttt aactgcatct tcaatggcct	4440
laccttcttc aggcaagttc aatgacaatt tcaacatcat tgcagcagac aagatagtgg	4500
cgatagggtc aaccttattc tttggcaaat ctggagcaga accgtggcat ggttcgtaca	4560
aaccaaatgc ggtgttcttg tctggcaaag aggccaagga cgcagatggc aacaaaccca	4620
aggaacctgg gataacggag gcttcategg agatgatatc accaaacatg ttgctgggtga	4680
ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taactaggat catggcggca gaatcaatca	4740
attgatgttg aaccttcaat gtagggaatt cgttcttgat ggtttcctcc acagtttttc	4800
tccataatct tgaagaggcc aaaagattag ctttatccaa ggaccaaata ggcaatggtg	4860
gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttcttgtgat tctttgactc tctggaacgg	4920
tgtattgttc actatcccaa gcgacaccat caccatcgtc ttctttcttc ttaccaaagt	4980
aaatacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt accttagca aattgtggct	5040
tgattggaga taagtctaaa agagagtcgg atgcaaagtt acatggtctt aagttggcgt	5100
acaattgaag ttctttacgg attttttagta aaccttggtc aggtctaaca ctaccggtac	5160
cccatttagg accagccaca gcaccttaaca aaacggcatc aaccttcttg gaggttcca	5220
gcgcctcact tggaagtggg acacctgtag catcgatagc agcaccacca attaaatgat	5280
tttcgaaatc gaacttgaca ttggaacgaa catcagaaat agctttaaga accttaatgg	5340
cttcggctgt gatttcttga ccaacgtggt cacctggcaa aacgacgac ttcttagggg	5400
cagacatagg ggcagacatt agaattggtat atccttgaaa tatatatata tattgctgaa	5460
atgtaaaagg taagaaaagt tagaaaagtaa gacgattgct aaccacctat tggaaaaaac	5520
aataggctct taaataatat tgtcaacttc aagtattgtg atgcaagcat ttagtcatga	5580
acgttctctc attctatatg aaaagccggt tccggcctct cacctttcct tttctccca	5640
atttttcagt tgaaaaagg atatgcgtca ggcgacctct gaaattaaca aaaaatttcc	5700
aglcacgaa ttgattctg tgcgatagcg cccctgtgtg ttctcgttat gttgaggaaa	5760
aaaataatgg ttgctaagag attcgaactc ttgcatctta cgatacctga gtattccac	5820
agttaactgc ggtcaagata tttcttgaat caggcgctct agaccgctcg gccaaacaac	5880
caattacttg ttgagaaata gagtataatt atcctataaa tataacgttt ttgaacacac	5940
atgaacaagg aagtacagga caattgattt tgaagagaat gtggattttg atgtaattgt	6000
tgggattcca tttttaataa ggcaataata ttaggtatgt ggatatacta gaagttctcc	6060
tcgaccgtcg atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac	6120
aggaaattgt aaacgttaat attttgtaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct	6180
cattttttta ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg	6240
agatagggtt gagtgttggt ccagtttgga acaagagtc actattaaag aacgtggact	6300

[0072]

ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg ccactacgt gaaccatcac	6360
cctaatacaag ttttttgggg tcgagggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga	6420
gcccccgatt tagagcttga cggggaaagc cggcgaaacgt ggcgagaaag gaagggaaga	6480
aagcgaaaagg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca	6540
ccacacccgc cgcgcttaat gcgcgctac agggcgcgctc gcgccattcg ccattcaggc	6600
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	6660
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	6720
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	6780
ccgggcccc cctcgaggtc gacgggtatcg ataagcttga tategaattc ctgcagcccc	6840
ggggatccgc atgcttgcat ttagtcgtgc aatgtatgac ttttaagattt gtgagcagga	6900
agaaaaggga gaatcttcta acgataaacc cttgaaaaac tgggtagact acgctatggt	6960
gagttgctac gcaggctgca caattacacg agaatgctcc cgcctaggat ttaaggctaa	7020
gggacgtgca atgcagacga cagatctaaa tgaccgtgtc ggtgaagtgt tcgccaaact	7080
tttcggttaa cacatgcagt gatgcacgcg cgatggtgct aagttacata tatatatata	7140
tatatatata tagccatagt gatgtctaag taacctttat ggtatatattc ttaatgtgga	7200
aagatactag cgcgcgcacc cacacacaag cttcgtcttt tcttgaagaa aagaggaagc	7260
tcgctaaatg ggattccact ttccgttccc tgccagctga tggaaaaagg ttagtggaac	7320
gatgaagaat aaaaagagag atccactgag gtgaaatttc agctgacagc gagtttcatg	7380
atcgtgatga acaatggtaa cgagttgtgg ctgttgccag ggagggtggt tctcaacttt	7440
taatgtatgg ccaaategct acttgggttt gttatataac aaagaagaaa taatgaactg	7500
attctcttcc tccttcttgt cctttcttaa ttctgttgta attaccttcc tttgtaattt	7560
tttttgtaat tattcttctt aataalccaa acaaacacac atattacaat agctagctga	7620
ggatgaaggc attagtttat catggggatc acaaaatttc gttagaagac aaacccaaac	7680
ccactctgca gaaaccaaca gacgttgtgg ttaggggtgtt gaaaacaaca atttgcggta	7740
ctgacttggg aatatacaaa ggtaagaatc ctgaagtggc agatggcaga atcctgggtc	7800
atgagggcgt tggcgtcatt gaagaagtgg gcgaatccgt gacacaattc aaaaaggggg	7860
ataaagtttt aatctcctgc gttactagct gtggatcgtg tgattattgc aagaagcaac	7920
tgtattcaca ctgtagagac ggtggctgga ttttaggtta catgatcgac ggtgtccaag	7980
ccgaatacgt cagaatacca catgctgaca attcattgta taagatcccg caaactatcg	8040
atgaigaaat tgcagtacta ctgtccgata ttttacctac tggacatgaa attggtgttc	8100
aatatggtaa cgttcaacca ggcgatgctg tagcaattgt aggagcaggt cctgttgga	8160
tgtcagtttt gttactgct caattttact cgcctagtac cattattggt atcgacatgg	8220
acgaaaaccg tttaacaatta gcgaaggagc ttggggccac acacactatt aactccggta	8280

[0073]

ctgaaaatgt tgtcgaagct gtgcacgta tagcagccga aggagtggat gtagcaatag	8340
aagctgttgg tatacccgca acctgggaca tctgtcagga aattgtaaaa cccggcgctc	8400
atattgccaa cgtgggagtt catgggttta aggtggactt tgaaattcaa aagttgtgga	8460
ttaagaatct aaccatcacc actggtttgg ttaacactaa tactacccca atgttgatga	8520
aggtagcctc tactgataaa ttgcctttaa agaaaatgat tactcacagg tttgagttag	8580
ctgaaatcga acacgcatac caggttttct tgaatggcgc taaagaaaaa gctatgaaga	8640
ttattctatc taatgcaggt gccgcctaata taattaagag taagcgaatt tcttatgatt	8700
tatgattttt attattaaat aagttataaa aaaaataagt gtatacaaat tttaaagtga	8760
ctcttaggtt ttaaaacgaa aattcttatt cttgagtaac tctttcctgt aggtcaggtt	8820
gctttctcag gtatagcatg aggtcgtctc tattgaccac acctctaccg gcacgccag	8880
caaatgcctg caaatcgtc cccatttcac ccaattgtag atatgctaac tccagcaatg	8940
agttgatgaa tctcgggtgt tattttatgt cctcagagga caacacctgt ggta	8994

<210> 64

<211> 753

<212> DNA

<213> 啤酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 64

gcacgttgc atttagtctg gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg	60
gagaatcttc taacgataaa ccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct	120
acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aaggacgtg	180
caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcgggtgaagt gttcgccaaa ctttctggtt	240
aacacatgca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tatatatata tatagccata	300
gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact agcgcgcgca	360
cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa tgggattcca	420
ctttccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga ataaaaagag	480
agateccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat gaacaatgtt	540
aacgagttgt ggctgttgcc agggagggtg gttctcaact tttaatgtat ggccaaatcg	600
ctaactgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt cctccttctt	660
gtcctttctt aattctgttg taattacctt cctttgtaat tttttttgta attattcttc	720
ttaataatcc aaacaaacac acatattaca ata	753

<210> 65

<211> 316

<212> DNA

<213> 啤酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 65

gagtaagcga atttcttatg atttatgatt tttattatta aataagttat aaaaaaata	60
--	----

[0074]

agtgatataca aatttttaaag tgactcttag gttttaaaac gaaaattctt attcttgagt	120
aactctttcc ttaggtcag gttgctttct caggtatagc atgaggtcgc tcttattgac	180
cacacctcta ccggcatgcc gagcaaatgc ctgcaaatcg ctccccattt cacccaattg	240
tagatatgct aactccagca atgagttgat gaatctcggg gtgtatttta tgctctcaga	300
ggacaacacc tgttgt	316

<210> 66
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 66	
cacacatatt acaatagcta gctgaggatg aaagctctg	39

<210> 67
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 67	
cagagctttc atctcagct agctattgta atatgtgtg	39

<210> 68
 <211> 9491
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 构建的质粒

<400> 68	
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataaatt cccgttttaa gagcttggtg agcgctagga gtcactgccg ggtatcgttt	240
gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta	300
ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat	360
tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttcta gcgattggca ttatcacata	420
atgaattata cattatataa agtaattgtga tttcttcgaa gaataacta aaaaatgagc	480
aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag cgtattacaa	540
atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaagggtgg tcccctagcg atagagcact	600
cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga	660

[0075]

ttaacgtcca cacaggtata gggtttcttg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt	720
ccggtctggc gctaategtt gaggtcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca	780
ctgaagactg cgggattgct ctcggtcaag ctttttaaaga ggccctacig gcgcgtggag	840
taaaaagggtt tggatcagga ttgcgccctt tggatgaggc actttccaga gcgggtggtag	900
atctttcgaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaagggag aaagtaggag	960
atctctcttg cgagatgac ccgcattttc ttgaaagctt tgcagaggt agcagaatta	1020
ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagttag agtgcgttca	1080
aggtctttgc ggttgccata agagaagcca cctcgcccaa tggtagcaac gatgttccct	1140
ccaccaaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatttaa agctgcagca tacgatatat	1200
atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat	1260
actgaagatg acaaggtaat gcacattctc atactgtca ttctgaacga ggccgcgttt	1320
cctttttct ttttgccttt tclllttttt tctcttgaa cgcacggatc tatgcgggtg	1380
gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgttaata	1440
ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg	1500
aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgtgttc	1560
cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa	1620
ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggt	1680
cgagggtccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag ccccgattt agagcttgac	1740
ggggaaagcc ggcgacgtg gcgagaaagg aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta	1800
gggcgtggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg	1860
cgccgttaca gggcgctgc gccattgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	1920
gacgggtgcg ggccctcttc ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	1980
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgac ttgtaaaacg acggccagt	2040
agcgcgcta atacgactca ctataggcg aattgggtac cgggcccccc ctgaggtgc	2100
acggcgccc actggttagag agcgactttg tatgccccaa ttgcgaaacc cgcgatatcc	2160
ttctcgatc tttagtaccc gaccaggaca aggaaaagga ggtcgaaacg tttttgaaga	2220
aacaagagga actacacgga agctctaaag atggcaacca gccagaaact aagaaaatga	2280
agttgatgga tccaactggc accgctggct tgaacaacaa taccagcctt ccaacttctg	2340
taaataacgg cggtaacgca gtgccaccag taccgttacc tttegggtata cctcctttcc	2400
ccatgtttcc aatgcccttc atgcctccaa cggtactat cacaaatcct catcaagctg	2460
acgcaagccc taagaaatga ataacaatac tgacagtact aaataattgc ctacttggt	2520
tcacatacgt tgcatacgtc gatatagata ataataataa tgacagcagg attatcgtaa	2580
tacgtaatag ttgaaaatct caaaaatgtg tgggtcatta cgtaaataat gataggaaat	2640

[0076]

ggattcttct atttttcctt ttccattct agcagccgtc gggaaaacgt ggcatectct	2700
ctttcgggct caattggagt cacgctgccg tgagcatcct ctctttccat atctaacaac	2760
tgagcacgta accaatggaa aagcatgagc ttagcggtgc tccaaaaaag tattggatgg	2820
ttaataccat ttgtctgttc tcttctgact ttgactcctc aaaaaaaaaa aatctacaat	2880
caacagatcg ctccaattac gccctcacaa aaactttttt ccttcttctt cgtccacgtt	2940
aaattttate cctcatgttg tctaacggat ttctgcactt gatttattat aaaagacaa	3000
agacataata cttctctatc aatttcagtt attgttcttc cttgcgttat tcttctgttc	3060
ttctttttct ttgtcatat ataaccataa ccaagtaata catattcaaa ctagtatgac	3120
tgacaaaaaa actcttaaag acttaagaaa tcgtagttct gtttacgatt caatgggttaa	3180
atcacctaata cgtgctatgt tgcgtgcaac tggatatgaa gatgaagact ttgaaaaacc	3240
tatcgtcggg gtcatttcaa cttgggctga aaacacacct tgtaatatcc acttacatga	3300
ctttggtaaa ctagccaaag tcgggtgttaa ggaagctggg gcttggccag ttcagttcgg	3360
aacaatcacg gtttctgatg gaatgccat gggaacccaa ggaatgcgtt tctccttgac	3420
atctcgtgat attattgcag attctattga agcagccatg ggaggtcata atgcggatgc	3480
ttttgtagcc attggcgggt gtgataaaaa catgcccggt tctgttatcg ctatggctaa	3540
catggatata ccagccattt ttgcttacgg cggaacaatt gcacctggta atttagacgg	3600
caaagatata gatttagtct ctgtctttga aggtgtcggc cattggaacc acggcgatat	3660
gaccaaagaa gaagttaaag ctttggaatg taatgcttgt cccggtcctg gaggtgcgg	3720
tggatatgat actgctaaca caatggcgac agctattgaa gttttgggac ttagccttcc	3780
gggttcattt tctcaccgg ctgaatccgc agaaaagaaa gcagatattg aagaagctgg	3840
tcgcgtgtt gtcaaaatgc tcgaaatggg cttaaaacct tctgacattt taacgcgtga	3900
agcttttgaa gatgctatta ctgtaactat ggctctggga ggttcaacca actcaacct	3960
tcacctetta gctattgcc atgctgctaa tgtggaattg acacttgatg atttcaatac	4020
tttccaagaa aaagttctc atttggctga ttgaaacct tctggtcaat atgtattcca	4080
agacctttac aaggtcggag gggtagcagc agttatgaaa tatctcctta aaaatggctt	4140
ccttcattgg gaccgtatca cttgtactgg caaaacagtc gctgaaaatt tgaaggttt	4200
tgatgattta acacctggc aaaaggttat tatgccgtt gaaaatccta aacgtgaaga	4260
tggtcgcctc attattctcc atggttaactt ggtccagac ggtgccgttg ccaaagtctc	4320
tgggtgaaaa gtgcgtcgtc atgctggctc tgctaaggct tttaattctg aagaagaagc	4380
cattgaagct gtcttgaatg atgataattg tgatggatg gttgttgcg tacgttttgt	4440
aggaccaaag ggcggctcctg gtatgcctga aatgctttcc ctttcatcaa tgattgttg	4500
taaagggcaa ggtgaaaaag ttgcccttct gacagatggc cgttctcag gtggtactta	4560
tggctctgtc gtgggtcata tcgctcctga agcacaagat ggcggtccaa tcgctacct	4620

[0077]

gcaaacagga gacatagtca ctattgacca agacactaag gaattacact ttgatatctc	4680
cgatgaagag ttaaaacatc gtcaagagac cattgaattg ccaccgctct attcacgcgg	4740
tatccttggg aaatatgctc acatcgtttc gtctgcttct aggggagccg taacagactt	4800
ttggaagcct gaagaaactg gcaaaaaatg ttgtcctggg tgctgtgggt aagcggccgc	4860
gttaattcaa attaattgat atagtttttt aatgagtatt gaatctgttt agaaataatg	4920
gaatattatt tttatttatt tttttatatt attggtcggc tcttttcttc tgaagggtcaa	4980
tgacaaaatg atatgaagga aataatgatt tctaaaattt tacaacgtaa gatattttta	5040
caaaagccta gctcatcttt tgctatgcac tttttactc acgcttgaaa ttaacggcca	5100
gtccactgcg gagtcatttc aaagtcatec taatcgatct atcgtttttg atagctcatt	5160
ttggagtctg cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aatttttatt tcattctgga	5220
actcttcgag ttctttgtaa agtctttcat agtagcttac tttatctcc aacatattta	5280
acttcatgtc aatttcggct cttaaatttt ccacatcate aagttcaaca tcactcttta	5340
acttgaattt attctctagc tcttccaacc aagcctcatt gctccttgat ttactgggtga	5400
aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaactttc ctgcaaagaa ttcaccaatt	5460
tctcgacatc atagtacaat ttgttttggt ctcccatcac aatttaatat acctgatgga	5520
ttcttatgaa gcgctgggta atggacgtgt cactctactt cgccttttcc cctactcctt	5580
ttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtaataa taatattatt aatcgccaaa	5640
aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcgtacca aacctgaatg	5700
cttcccaatt gtatattaag agtcataca gcaacatatt cttgttatta aattaattat	5760
tattgatttt tgatattgta taaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat	5820
accaagtatg gagaaatata ttagaagtct atacgttaaa ccaccgcggg ggagctccag	5880
cttttgttcc ctttagtgag ggtaattgc gcgcttgccg taatcatggg catagctgtt	5940
tcctgtgtga aattgttate cgctcacaat tccacacaac ataggagccg gaagcataaa	6000
gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagtgcg gtaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact	6060
gcccgttttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	6120
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttcgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg	6180
ctcggtcgtt cggtgcggc gagcgggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttacc	6240
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag	6300
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt ttccatagg ctccgcccc ctgacgagca	6360
tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca	6420
ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttacgg	6480
atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag	6540
gtatctcagt tcgggtgtag tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt	6600

[0078]

tcagcccgac cgtcgcgct tatecggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca	6660
cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg	6720
cgggtgctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt	6780
tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc	6840
cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg	6900
cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg	6960
gaacgaaaa tcacgttaag ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta	7020
gaccttttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg	7080
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg	7140
ttcatccata gttgcctgac tcccgcgtg gtagataact acgatacggg agggcttacc	7200
atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatac	7260
agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcagaaagt ggtcctgcaa ctttatccgc	7320
ctccatccag tctattaatt gttgcgggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag	7380
tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat	7440
ggcttcattc agctccggtt cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg	7500
caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc gatcgttgct agaagtaagt tggccgcagt	7560
gttatactc atggttatgg cagcaactgca taattctctt actgtcatgc catcgtaag	7620
atgcttttct gtgactgggt agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatcgggcg	7680
accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt	7740
aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgt	7800
gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac	7860
tttaccacgc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat	7920
aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat	7980
ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca	8040
aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct gaacgaagca tctgtgcttc	8100
atittgtaga acaaaaatgc aacgcgagag cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct	8160
gcatttttac agaacagaaa tgcaacgcga aagcgtatt ttaccaacga agaactgtg	8220
cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc gagagcgcta atttttcaaa caaagaatct	8280
gagctgcatt ttacagaac agaaatgcaa cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat	8340
ctatacttct tttttgttci acaaaaatgc atcccagagag cgctattttt ctaacaaagc	8400
atcttagatt acttttttct tcttttgtgc gctctataat gcagtctctt gataactttt	8460
tgcactgtag gtccgttaag gttagaagaa ggctactttg gtgtctattt tctcttccat	8520
aaaaaaagcc tgaactccact tcccgcgttt actgattact agcgaagctg cgggtgcatt	8580

[0079]

ttttcaagat aaaggcatcc cegattatat tctataccga tgtggattgc gcatactttg	8640
tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct tcattgggtca gaaaattatg aacggtttct	8700
tctattttgt ctctatatac tacgtatagg aaatgtttac attttcgtat tgttttcgat	8760
tcactctatg aatagttctt actacaattt ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa	8820
cataaaaaat gtagaggteg agtttagatg caagtccaag gagcgaaagg tggatgggta	8880
ggttatatag ggatatagca cagagatata tagcaaagag atacttttga gcaatgtttg	8940
tggaagcggg attcgcaata ttttagtagc tcgttacagt ccggtgcgtt tttggttttt	9000
tgaaagtgcg tcttcagagc gcttttggtt ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt	9060
ctagagaata ggaacttcgg aataggaact tcaaagcgtt tccgaaaacg agcgcttccg	9120
aaaatgcaac gcgagctgcg cacatacagc tcactgttca cgtcgcacct atatctgcgt	9180
gttgccctgta tatatatata catgagaaga acggcatagt gcgtgtttat gcttaaatgc	9240
gtacttatat gcgtctatct atgtaggatg aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta	9300
tccattcca tgccgggtat cgtatgcttc cttcagcact accctttage tgttctatat	9360
gctgccactc ctcaattgga ttagtctcat ccttcaatgc tatcatttcc tttgatattg	9420
gatcatctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaatagge gtatcacgag	9480
gccctttcgt c	9491

<210> 69

<211> 1000

<212> DNA

<213> 啤酒糖酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

<400> 69

gttaattcaa attaattgat atagtttttt aatgagtatt gaatctgttt agaaataatg	60
gaatattatt tttatttatt tttttatatt attggtcggc tcttttcttc tgaaggtcaa	120
tgacaaaatg atatgaagga aataatgatt tctaaaattt tacaacgtaa gatattttta	180
caaaagccta gctcatcttt tgcatgcac tttttactc acgcttgaaa ttaacggcca	240
gtccactgcg gagtcatttc aaagtcatcc taatcgatct atcgtttttg atagctcatt	300
ttggagttec cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aatttttatt tcattctgga	360
actcttcgag ttctttgtaa agtctttcat agtagcttac tttatcctcc aacatattta	420
acttcatgtc aatttcggct cttaaatttt ccacatcatc aagttcaaca tcacttttta	480
acttgaattt attctctage tcttccaacc aagcctcatt gctccttgat ttactggtga	540
aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaactttc ctgcaaagaa ttcaccaatt	600
tctcgacatc atagtacaat ttgttttggt ctcccatcac aatttaatat acctgatgga	660
ttcttatgaa gcgctgggta atggacgtgt cactctactt cgcctttttc cctactcctt	720
ttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtaataa taatattatt aatcggcaaa	780

[0080]

aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcgtaccaa tccttgaatg 840
 cttcccaatt gtatatataag agtcatcaca gcaacatatt cttgttatta aattaattat 900
 tattgatttt tgatattgta taaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat 960
 accaagtatg gagaaatata ttagaagtct atacgttaaa 1000

<210> 70
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)
 <400> 70

Met Ser Glu Leu Asn Glu Lys Leu Ala Thr Ala Trp Glu Gly Phe Thr
 1 5 10 15

Lys Gly Asp Trp Gln Asn Glu Val Asn Val Arg Asp Phe Ile Gln Lys
 20 25 30

Asn Tyr Thr Pro Tyr Glu Gly Asp Glu Ser Phe Leu Ala Gly Ala Thr
 35 40 45

Glu Ala Thr Thr Thr Leu Trp Asp Lys Val Met Glu Gly Val Lys Leu
 50 55 60

Glu Asn Arg Thr His Ala Pro Val Asp Phe Asp Thr Ala Val Ala Ser
 65 70 75 80

Thr Ile Thr Ser His Asp Ala Gly Tyr Ile Asn Lys Gln Leu Glu Lys
 85 90 95

Ile Val Gly Leu Gln Thr Glu Ala Pro Leu Lys Arg Ala Leu Ile Pro
 100 105 110

Phe Gly Gly Ile Lys Met Ile Glu Gly Ser Cys Lys Ala Tyr Asn Arg
 115 120 125

Glu Leu Asp Pro Met Ile Lys Lys Ile Phe Thr Glu Tyr Arg Lys Thr
 130 135 140

His Asn Gln Gly Val Phe Asp Val Tyr Thr Pro Asp Ile Leu Arg Cys
 145 150 155 160

Arg Lys Ser Gly Val Leu Thr Gly Leu Pro Asp Ala Tyr Gly Arg Gly
 165 170 175

Arg Ile Ile Gly Asp Tyr Arg Arg Val Ala Leu Tyr Gly Ile Asp Tyr
 180 185 190

Leu Met Lys Asp Lys Leu Ala Gln Phe Thr Ser Leu Gln Ala Asp Leu
 195 200 205

[0081]

Glu Asn Gly Val Asn Leu Glu Gln Thr Ile Arg Leu Arg Glu Glu Ile
210 215 220

Ala Glu Gln His Arg Ala Leu Gly Gln Met Lys Glu Met Ala Ala Lys
225 230 235 240

Tyr Gly Tyr Asp Ile Ser Gly Pro Ala Thr Asn Ala Gln Glu Ala Ile
245 250 255

Gln Trp Thr Tyr Phe Gly Tyr Leu Ala Ala Val Lys Ser Gln Asn Gly
260 265 270

Ala Ala Met Ser Phe Gly Arg Thr Ser Thr Phe Leu Asp Val Tyr Ile
275 280 285

Glu Arg Asp Leu Lys Ala Gly Lys Ile Thr Glu Gln Glu Ala Gln Glu
290 295 300

Met Val Asp His Leu Val Met Lys Leu Arg Met Val Arg Phe Leu Arg
305 310 315 320

Thr Pro Glu Tyr Asp Glu Leu Phe Ser Gly Asp Pro Ile Trp Ala Thr
325 330 335

Glu Ser Ile Gly Gly Met Gly Leu Asp Gly Arg Thr Leu Val Thr Lys
340 345 350

Asn Ser Phe Arg Phe Leu Asn Thr Leu Tyr Thr Met Gly Pro Ser Pro
355 360 365

Glu Pro Asn Met Thr Ile Leu Trp Ser Glu Lys Leu Pro Leu Asn Phe
370 375 380

Lys Lys Phe Ala Ala Lys Val Ser Ile Asp Thr Ser Ser Leu Gln Tyr
385 390 395 400

Glu Asn Asp Asp Leu Met Arg Pro Asp Phe Asn Asn Asp Asp Tyr Ala
405 410 415

Ile Ala Cys Cys Val Ser Pro Met Ile Val Gly Lys Gln Met Gln Phe
420 425 430

Phe Gly Ala Arg Ala Asn Leu Ala Lys Thr Met Leu Tyr Ala Ile Asn
435 440 445

Gly Gly Val Asp Glu Lys Leu Lys Met Gln Val Gly Pro Lys Ser Glu
450 455 460

[0082]

Pro Ile Lys Gly Asp Val Leu Asn Tyr Asp Glu Val Met Glu Arg Met
 465 470 475 480
 Asp His Phe Met Asp Trp Leu Ala Lys Gln Tyr Ile Thr Ala Leu Asn
 485 490 495
 Ile Ile His Tyr Met His Asp Lys Tyr Ser Tyr Glu Ala Ser Leu Met
 500 505 510
 Ala Leu His Asp Arg Asp Val Ile Arg Thr Met Ala Cys Gly Ile Ala
 515 520 525
 Gly Leu Ser Val Ala Ala Asp Ser Leu Ser Ala Ile Lys Tyr Ala Lys
 530 535 540
 Val Lys Pro Ile Arg Asp Glu Asp Gly Leu Ala Ile Asp Phe Glu Ile
 545 550 555 560
 Glu Gly Glu Tyr Pro Gln Phe Gly Asn Asn Asp Pro Arg Val Asp Asp
 565 570 575
 Leu Ala Val Asp Leu Val Glu Arg Phe Met Lys Lys Ile Gln Lys Leu
 580 585 590
 His Thr Tyr Arg Asp Ala Ile Pro Thr Gln Ser Val Leu Thr Ile Thr
 595 600 605
 Ser Asn Val Val Tyr Gly Lys Lys Thr Gly Asn Thr Pro Asp Gly Arg
 610 615 620
 Arg Ala Gly Ala Pro Phe Gly Pro Gly Ala Asn Pro Met His Gly Arg
 625 630 635 640
 Asp Gln Lys Gly Ala Val Ala Ser Leu Thr Ser Val Ala Lys Leu Pro
 645 650 655
 Phe Ala Tyr Ala Lys Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Phe Ser Ile Val Pro
 660 665 670
 Asn Ala Leu Gly Lys Asp Asp Glu Val Arg Lys Thr Asn Leu Ala Gly
 675 680 685
 Leu Met Asp Gly Tyr Phe His His Glu Ala Ser Ile Glu Gly Gly Gln
 690 695 700
 His Leu Asn Val Asn Val Met Asn Arg Glu Met Leu Leu Asp Ala Met
 705 710 715 720
 Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr Ile Arg Val Ser Gly Tyr
 725 730 735

[0083]

Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Lys Glu Gln Gln Gln Asp Val Ile
740 745 750

Thr Arg Thr Phe Thr Gln Ser Met
755 760

<210> 71
<211> 2283
<212> DNA
<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 71
atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttaccaa aggtgactgg 60
cagaatgaag taaacgtccg tgacttcatt cagaaaaact acactccgta cgagggtgac 120
gagtccttcc tggctggcgc tactgaagcg accaccaccc tgtgggacaa agtaatggaa 180
ggcgttaaac tggaaaaccg cactcacgcg ccagttgact ttgacaccgc tgttgcttcc 240
accatcacct ctccagacgc tggctacatc aacaagcagc ttgagaaaat cgttggctcg 300
cagactgaag ctccgctgaa acgtgctctt atcccgttcg gtggtatcaa aatgatcgaa 360
ggttcttgca aagcgtacaa ccgcgaactg gatccgatga tcaaaaaaat cttcactgaa 420
taccgtaaaa ctcaacaacca gggcgtgttc gacgtttaca ctccggacat cctgcgttgc 480
cgtaaatctg gtgttctgac cggctctgcca gatgcatatg gccgtggccg tatcatcggt 540
gactaccgtc gcgttgccgt gtacggtatc gactacctga tgaaagacaa actggcacag 600
ttcacttctc tgcaggtgta tctggaaaac ggcgtaaacc tggaacagac tatecgctcg 660
cgcgaaagaaa tcgctgaaca gcaccgcgct ctgggtcaga tgaaagaaat ggctgcgaaa 720
tacggetacg acatctctgg tccggetacc aacgctcagg aagctatcca gtggacttac 780
ttcggctacc tggctgctgt taagtctcag aacgggtgctg caatgtcctt cggctcgtacc 840
tccaccttcc tggatgtgta catcgaacgt gacctgaaag ctggcaagat caccgaacaa 900
gaagcgcagg aaatggttga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg cttcctgcgt 960
actccggaat acgatgaact gttctctggc gaccgatctt gggcaaccga atctatcggt 1020
ggtatgggccc tcgacggctg taccctgggt accaaaaaca gettccgttt cctgaacacc 1080
ctgtacacca tgggtccgtc tccggaaccg aacatgacca ttctgtggtc tgaaaaactg 1140
ccgctgaact tcaagaaatt cgcgcgtaaa gtgtccatcg acacctcttc tctgcagtat 1200
gagaacgatg acctgatgcg tccggacttc aacaacgatg actacgctat tgcttgctgc 1260
gtaagccccg tgatcgttgg taaacaaatg cagttcttcg gtgcgcgtgc aaacctggcg 1320
aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgacgaaa aactgaaaat gcaggttggt 1380
ccgaagtctg aaccgatcaa aggcgatgct ctgaactatg atgaagtgat ggagcgcgatg 1440
gatcaattca tggactggct ggctaaacag tacatcactg cactgaacat catecactac 1500

[0084]

```

atgcacgaca agtacagcta cgaagcctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttate 1560
cgcaccatgg cgtgtggtat cgtctggtctg tccgttgctg ctgactccct gtctgcaatc 1620
aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga cttcgaaatc 1680
gaaggcgaat acccgagtt tggtaacaat gatccgctg tagatgacct ggctgttgac 1740
ctggtagaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgtga cgctatcccg 1800
actcagctcg ttctgacat cacttctaac gttgtgtatg gtaagaaaac gggtaacacc 1860
ccagacggtc gtctgtctgg cgcgcggttc ggaccgggtg ctaaccgat gcacggctcg 1920
gaccagaaag gtgcagtagc ctctctgact tccgttgcta aactgccgtt tgcttacgct 1980
aaagatggta tctctacac cttctctatc gttccgaacg cactgggtaa agacgacgaa 2040
gttcgtaaga ccaacctggc tggctctgat gatggttact tccaccaga agcatccatc 2100
gaagggtgac agcacctgaa cgttaacgtg atgaaccgtg aaatgctgct cgacgcgatg 2160
gaaaaccggg aaaaatatcc gcagctgacc atccgtgtat ctggctacgc agtacgtttc 2220
aactcgtgta ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtacctcac tcaatctatg 2280
taa 2283

```

<210> 72
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 72

Met Ala Glu Met Lys Asn Leu Lys Ile Glu Val Val Arg Tyr Asn Pro
1 5 10 15

Glu Val Asp Thr Ala Pro His Ser Ala Phe Tyr Glu Val Pro Tyr Asp
20 25 30

Ala Thr Thr Ser Leu Leu Asp Ala Leu Gly Tyr Ile Lys Asp Asn Leu
35 40 45

Ala Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Trp Ser Cys Arg Met Ala Ile Cys Gly
50 55 60

Ser Cys Gly Met Met Val Asn Asn Val Pro Lys Leu Ala Cys Lys Thr
65 70 75 80

Phe Leu Arg Asp Tyr Thr Asp Gly Met Lys Val Glu Ala Leu Ala Asn
85 90 95

Phe Pro Ile Glu Arg Asp Leu Val Val Asp Met Thr His Phe Ile Glu
100 105 110

Ser Leu Glu Ala Ile Lys Pro Tyr Ile Ile Gly Asn Ser Arg Thr Ala
115 120 125

[0085]

Asp Gln Gly Thr Asn Ile Gln Thr Pro Ala Gln Met Ala Lys Tyr His
130 135 140

Gln Phe Ser Gly Cys Ile Asn Cys Gly Leu Cys Tyr Ala Ala Cys Pro
145 150 155 160

Gln Phe Gly Leu Asn Pro Glu Phe Ile Gly Pro Ala Ala Ile Thr Leu
165 170 175

Ala His Arg Tyr Asn Glu Asp Ser Arg Asp His Gly Lys Lys Glu Arg
180 185 190

Met Ala Gln Leu Asn Ser Gln Asn Gly Val Trp Ser Cys Thr Phe Val
195 200 205

Gly Tyr Cys Ser Glu Val Cys Pro Lys His Val Asp Pro Ala Ala Ala
210 215 220

Ile Gln Gln Gly Lys Val Glu Ser Ser Lys Asp Phe Leu Ile Ala Thr
225 230 235 240

Leu Lys Pro Arg

<210> 73
<211> 735
<212> DNA
<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 73
atggctgaga tgaaaaacct gaaaattgag gtggtgcgct ataaccggga agtcgatacc 60
gcaccgcata ggcatttcta tgaagtgcct tatgacgcaa ctacctcatt actggatgcg 120
ctgggctaca tcaaagacaa cctggcaccg gacctgagct accgctggtc ctgccgtatg 180
gcgattttgtg gttcctgcgg catgatggtt aacaacgtgc caaaactggc atgtaaaacc 240
ttcctgcgtg attacaccga cggatatgaag gttgaagcgt tagctaactt cccgattgaa 300
cgcgatctgg tggtcgatat gaccacttc atcgaaagtc tggaagegat caaacgtac 360
atcatcgga actccgcac cgcggatcag ggtactaaca tccagacccc ggcgagatg 420
gcgaagtatc accagttctc cggttgcac aactgtggtt tgtgctacgc cgcgtgcccc 480
cagtttgccc tgaaccaga gttcatcggt ccggtgcca ttacgtggc gcatcgttat 540
aacgaagata gccgcgacca cggtaagaag gagcgtatgg cgcagttgaa cagccagaac 600
ggcgtatgga gctgtacttt cgtgggctac tgctccgaag tctgcccga acacgtcgat 660
ccggctgcgg ccattcagca gggcaaagta gaaagttega aagactttct tatecgacc 720
ctgaaaccac gctaa 735

[0086]

<210> 74
 <211> 891
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

 <400> 74

 Met Ala Val Thr Asn Val Ala Glu Leu Asn Ala Leu Val Glu Arg Val
 1 5 10 15

 Lys Lys Ala Gln Arg Glu Tyr Ala Ser Phe Thr Gln Glu Gln Val Asp
 20 25 30

 Lys Ile Phe Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Asp Ala Arg Ile Pro
 35 40 45

 Leu Ala Lys Met Ala Val Ala Glu Ser Gly Met Gly Ile Val Glu Asp
 50 55 60

 Lys Val Ile Lys Asn His Phe Ala Ser Glu Tyr Ile Tyr Asn Ala Tyr
 65 70 75 80

 Lys Asp Glu Lys Thr Cys Gly Val Leu Ser Glu Asp Asp Thr Phe Gly
 85 90 95

 Thr Ile Thr Ile Ala Glu Pro Ile Gly Ile Ile Cys Gly Ile Val Pro
 100 105 110

 Thr Thr Asn Pro Thr Ser Thr Ala Ile Phe Lys Ser Leu Ile Ser Leu
 115 120 125

 Lys Thr Arg Asn Ala Ile Ile Phe Ser Pro His Pro Arg Ala Lys Asp
 130 135 140

 Ala Thr Asn Lys Ala Ala Asp Ile Val Leu Gln Ala Ala Ile Ala Ala
 145 150 155 160

 Gly Ala Pro Lys Asp Leu Ile Gly Trp Ile Asp Gln Pro Ser Val Glu
 165 170 175

 Leu Ser Asn Ala Leu Met His His Pro Asp Ile Asn Leu Ile Leu Ala
 180 185 190

 Thr Gly Gly Pro Gly Met Val Lys Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro
 195 200 205

 Ala Ile Gly Val Gly Ala Gly Asn Thr Pro Val Val Ile Asp Glu Thr
 210 215 220

 Ala Asp Ile Lys Arg Ala Val Ala Ser Val Leu Met Ser Lys Thr Phe
 225 230 235 240

[0087]

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

[0088]

Asp Gln Ile Thr Ser Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Glu Thr Glu Val
 500 505 510

Phe Phe Glu Val Glu Ala Asp Pro Thr Leu Ser Ile Val Arg Lys Gly
 515 520 525

Ala Glu Leu Ala Asn Ser Phe Lys Pro Asp Val Ile Ile Ala Leu Gly
 530 535 540

Gly Gly Ser Pro Met Asp Ala Ala Lys Ile Met Trp Val Met Tyr Glu
 545 550 555 560

His Pro Glu Thr His Phe Glu Glu Leu Ala Leu Arg Phe Met Asp Ile
 565 570 575

Arg Lys Arg Ile Tyr Lys Phe Pro Lys Met Gly Val Lys Ala Lys Met
 580 585 590

Ile Ala Val Thr Thr Thr Ser Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Pro Phe
 595 600 605

Ala Val Val Thr Asp Asp Ala Thr Gly Gln Lys Tyr Pro Leu Ala Asp
 610 615 620

Tyr Ala Leu Thr Pro Asp Met Ala Ile Val Asp Ala Asn Leu Val Met
 625 630 635 640

Asp Met Pro Lys Ser Leu Cys Ala Phe Gly Gly Leu Asp Ala Val Thr
 645 650 655

His Ala Met Glu Ala Tyr Val Ser Val Leu Ala Ser Glu Phe Ser Asp
 660 665 670

Gly Gln Ala Leu Gln Ala Leu Lys Leu Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Ala
 675 680 685

Ser Tyr His Glu Gly Ser Lys Asn Pro Val Ala Arg Glu Arg Val His
 690 695 700

Ser Ala Ala Thr Ile Ala Gly Ile Ala Phe Ala Asn Ala Phe Leu Gly
 705 710 715 720

Val Cys His Ser Met Ala His Lys Leu Gly Ser Gln Phe His Ile Pro
 725 730 735

His Gly Leu Ala Asn Ala Leu Leu Ile Cys Asn Val Ile Arg Tyr Asn
 740 745 750

Ala Asn Asp Asn Pro Thr Lys Gln Thr Ala Phe Ser Gln Tyr Asp Arg
 755 760 765

[0089]

Pro Gln Ala Arg Arg Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu
770 775 780

Ser Ala Pro Gly Asp Arg Thr Ala Ala Lys Ile Glu Lys Leu Leu Ala
785 790 795 800

Trp Leu Glu Thr Leu Lys Ala Glu Leu Gly Ile Pro Lys Ser Ile Arg
805 810 815

Glu Ala Gly Val Gln Glu Ala Asp Phe Leu Ala Asn Val Asp Lys Leu
820 825 830

Ser Glu Asp Ala Phe Asp Asp Gln Cys Thr Gly Ala Asn Pro Arg Tyr
835 840 845

Pro Leu Ile Ser Glu Leu Lys Gln Ile Leu Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly
850 855 860

Arg Asp Tyr Val Glu Gly Glu Thr Ala Ala Lys Lys Glu Ala Ala Pro
865 870 875 880

Ala Lys Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Ser Ala
885 890

<210> 75

<211> 2676

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 75

```
atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtaaa aaaagcccag      60
cgtgaatatg ccagtttcac tcaagagcaa gtagacaaaa tcttcgcgcg cgccgctctg      120
gctgctgcag atgctcgaat cccactcgcg aaaatggccg ttgccgaatc cggcattgggt      180
atcgctgaag ataaagtgat caaaaaccac tttgcttctg aatatatcta caacgcctat      240
aaagatgaaa aaacctgtgg tgttctgtct gaagacgaca ctttttgtac catcactatc      300
gctgaaccaa tcggtattat ttgcggtatc gtcccgacca ctaaccgac ttcaactgct      360
atcttcaaat cgctgatcag tctgaagacc cgtaacgcca ttatcttctc ccgcacccg      420
cgtgcaaaag atgccaccaa caaagcggtc gatatcggtc tgcaggtgc tatcgctgcc      480
ggtgctccga aagatctgat cggttgatc gatcaacctt ctgttgaact gtctaacgca      540
ctgatgcacc acccagacat caacctgac ctcgcgactg gtggtccggg catggttaaa      600
gccgcataca gctccggtaa accagctatc ggtgtaggcg cgggcaacac tccagttgtt      660
atcgatgaaa ctgctgatat caaacgtgca gttgcatctg tactgatgtc caaaaccttc      720
gacaacggcg taatctgtgc ttctgaacag tctgttgttg ttgttgactc tgtttatgac      780
```

[0090]

gctgtacgtg aacgttttgc aacccacggc ggctatctgt tgcagggtaa agagctgaaa	840
gctgttcagg atgttatcct gaaaaacggg gcgctgaacg cggctatcgt tggtcagcca	900
gcctataaaa ttgtgaact ggcaggttc tctgtaccag aaaacaccaa gattctgac	960
gggtgaagtga ccgttgttga tgaaagcgaa ccgttcgcac atgaaaaact gtccccgact	1020
ctggcaatgt accgcgctaa agatttcgaa gacgcggtag aaaaagcaga gaaactgggt	1080
gctatgggag gtatcgggtca tacctcttgc ctgtacactg accaggataa ccaaccggct	1140
cgcgtttctt acttcgggtca gaaaatgaaa acggcgcgta tcttgattaa caccacagcg	1200
tctcaggggtg gtatcgggtga cctgtataac ttcaaacctg caccttcctt gactctgggt	1260
tgtggttctt ggggtggtaa ctccatctct gaaaacgttg gtccgaaaca cctgatcaac	1320
aagaaaaccg ttgctaagcg agctgaaaac atgttgtggc acaaacttcc gaaatctatc	1380
tacttcggcc gtggctccct gccaatcgcg ctggatgaag tgattactga tggccacaaa	1440
cgtgcgctca tcgtgactga ccgcttcctg ttcaacaatg gttatgctga tcagatcact	1500
tccgtactga aagcagcagg cgttgaaact gaagtcttct tcgaagtaga agcggacccg	1560
accctgagca tcgttcgtaa aggtgcagaa ctggcaaacct ccttcaaacc agacgtgatt	1620
atcgcgctgg gtgggtgggtc cccgatggac gccgcgaaga tcatgtgggt tatgtacgaa	1680
catecggaaa ctcaacttga agagctggcg ctgcgcctta tggatatccg taaacgtatc	1740
tacaagttcc cgaaaatggg cgtgaaagcg aaaatgatcg ctgtcaccac cacttctgggt	1800
acaggttctg aagtcactcc gtttgcgggt gtaactgacg acgctactgg tcagaaatat	1860
ccgctggcag actatgcgct gactccggat atggcgattg tcgacgcaa cctggttatg	1920
gacatgccga agtccciglg tgctttcgggt ggtctggacg cagtaactca cgccatggaa	1980
gcttatgttt ctgtaactggc atctgagttc tctgatggtc aggcctctga ggcactgaaa	2040
ctgctgaaag aatatctgcc agcgtcctac cacgaagggt ctaaaaatcc ggtagcgcgt	2100
gaacgtgttc acagtgcagc gactatcgcg ggtatcgcgt ttgcgaacgc cttcctgggt	2160
gtatgtcact caatggcgca caaactgggt tcccagttcc atattccgca cggctctggca	2220
aacgcctgc tgatttgtaa cgttatcgc tacaatgca acgacaaccc gaccaagcag	2280
actgcattca gccagtatga ccgtccgcag gctcgcgctc gttatgctga aattgccgac	2340
cacttgggtc tgagcgcacc gggcgaccgt actgctgcta agatcgagaa actgctggca	2400
tggctggaag cgctgaaagc tgaactgggt attccgaaat ctatccgtga agctggcggt	2460
caggaagcag acttcctggc gaacgtggat aaactgtctg aagatgcatt cgatgaccag	2520
tgcacggcg ctaacccgcg ttacccgctg atctcgcagc tgaaacagat tctgctggat	2580
acctactacg gtcgtgatta tgtagaaggt gaaactgcag cgaagaaaga agctgctccg	2640
gctaaagctg agaaaaaagc gaaaaaatcc gcttaa	2676

<210> 76

[0091]

<211> 329
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)
 <400> 76
 Met Lys Leu Ala Val Tyr Ser Thr Lys Gln Tyr Asp Lys Lys Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Gln Val Asn Glu Ser Phe Gly Phe Glu Leu Glu Phe Phe Asp Phe
 20 25 30
 Leu Leu Thr Glu Lys Thr Ala Lys Thr Ala Asn Gly Cys Glu Ala Val
 35 40 45
 Cys Ile Phe Val Asn Asp Asp Gly Ser Arg Pro Val Leu Glu Glu Leu
 50 55 60
 Lys Lys His Gly Val Lys Tyr Ile Ala Leu Arg Cys Ala Gly Phe Asn
 65 70 75 80
 Asn Val Asp Leu Asp Ala Ala Lys Glu Leu Gly Leu Lys Val Val Arg
 85 90 95
 Val Pro Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Val Ala Glu His Ala Ile Gly Met
 100 105 110
 Met Met Thr Leu Asn Arg Arg Ile His Arg Ala Tyr Gln Arg Thr Arg
 115 120 125
 Asp Ala Asn Phe Ser Leu Glu Gly Leu Thr Gly Phe Thr Met Tyr Gly
 130 135 140
 Lys Thr Ala Gly Val Ile Gly Thr Gly Lys Ile Gly Val Ala Met Leu
 145 150 155 160
 Arg Ile Leu Lys Gly Phe Gly Met Arg Leu Leu Ala Phe Asp Pro Tyr
 165 170 175
 Pro Ser Ala Ala Ala Leu Glu Leu Gly Val Glu Tyr Val Asp Leu Pro
 180 185 190
 Thr Leu Phe Ser Glu Ser Asp Val Ile Ser Leu His Cys Pro Leu Thr
 195 200 205
 Pro Glu Asn Tyr His Leu Leu Asn Glu Ala Ala Phe Glu Gln Met Lys
 210 215 220
 Asn Gly Val Met Ile Val Asn Thr Ser Arg Gly Ala Leu Ile Asp Ser
 225 230 235 240

[0092]

Gln Ala Ala Ile Glu Ala Leu Lys Asn Gln Lys Ile Gly Ser Leu Gly
 245 250 255

Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Arg Asp Leu Phe Phe Glu Asp Lys Ser
 260 265 270

Asn Asp Val Ile Gln Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ala Cys His
 275 280 285

Asn Val Leu Phe Thr Gly His Gln Ala Phe Leu Thr Ala Glu Ala Leu
 290 295 300

Thr Ser Ile Ser Gln Thr Thr Leu Gln Asn Leu Ser Asn Leu Glu Lys
 305 310 315 320

Gly Glu Thr Cys Pro Asn Glu Leu Val
 325

<210> 77
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 77
 atgaaactcg ccgtttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacctgca acaggtgaac 60
 gagtcctttg gctttgagct ggaatTTTTT gactttctgc tgacggaaaa aaccgctaaa 120
 actgccaatg gctgcgaagc ggtatgtatt ttcgtaaagc atgacggcag ccgcccggtg 180
 ctggaagagc tgaaaaagca cggcggttaa tatatcgccc tgcgctgtgc cggtttcaat 240
 aacgtcgacc ttgacgcggc aaaagaactg gggctgaaag tagtccgtgt tccagcctat 300
 gatccagagg ccgttgetga acacgccatc ggtatgatga tgacgctgaa ccgccgtatt 360
 caccgcgcgt atcagcgtae ccgtgatgct aacttctctc tggaaggctt gaccggcttt 420
 actatgtatg gcaaaacggc aggcgttata ggtaccggta aaatcgggtg ggcgatgctg 480
 cgcattctga aaggtttttg tatgcgtctg ctggcggttc atccgtatcc aagtgcagcg 540
 gcgciggaac tcggtgtgga gtatgtcgat ctgccaaccc tgttctctga atcagacgtt 600
 atctctctgc actgcccgtc gacaccggaa aactatcatt tgttgaacga agccgccttc 660
 gaacagatga aaaatggcgt gatgatcgtc aataccagtc gcggtgcatt gattgattct 720
 caggcagcaa ttgaagcgt gaaaaatcag aaaattggtt cgttgggtat ggacgtgtat 780
 gagaacgaac gcgatctatt ctttgaagat aaatccaacg acgtgatcca ggatgacgta 840
 ttccgtcgcc tgtctgcctg ccacaacgtg ctglttaccg ggcaccagga attcctgaca 900
 gcagaagctc tgaccagtat ttctcagact acgtgcaaa acttaagcaa tctggaaaaa 960
 ggcgaaacct gcccgaaacga actggtttaa 990

<210> 78

[0093]

<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	引物	
<400>	78	
	tcatcactga taacctgatt ccgg	24
<210>	79	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	79	
	cgagtctggt ttggcagtca ccttaa	26
<210>	80	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	80	
	gagcgtgacg acgtcaactt cct	23
<210>	81	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	81	
	cagttcaatg ctgaaccaca cag	23
<210>	82	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	82	
	gaaggttgcg cctacactaa gca	23
<210>	83	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	83	
	gggagcggca agattaaacc agt	23

[0094]

<210>	84	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	84	
	tggatcacgt aatcagtacc cag	23
<210>	85	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	85	
	atccttaact gatcggcatt gcc	23
<210>	86	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	86	
	ggaattcaca catgaaagct ctggtttatc	30
<210>	87	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	87	
	gcgtccaggg cgtcaaagat caggcagc	28
<210>	88	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	88	
	gacctaggag gtcacacatg aaagctctgg	30
<210>	89	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0095]

<220>

<223> 引物

<400> 89

cgactctaga ggatccccgg gtacc

25

<210> 90

<211> 602

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 90

Met Gln Thr Phe Gln Ala Asp Leu Ala Ile Val Gly Ala Gly Gly Ala
1 5 10 15

Gly Leu Arg Ala Ala Ile Ala Ala Ala Gln Ala Asn Pro Asn Ala Lys
20 25 30

Ile Ala Leu Ile Ser Lys Val Tyr Pro Met Arg Ser His Thr Val Ala
35 40 45

Ala Glu Gly Gly Ser Ala Ala Val Ala Gln Asp His Asp Ser Phe Glu
50 55 60

Tyr His Phe His Asp Thr Val Ala Gly Gly Asp Trp Leu Cys Glu Gln
65 70 75 80

Asp Val Val Asp Tyr Phe Val His His Cys Pro Thr Glu Met Thr Gln
85 90 95

Leu Glu Leu Trp Gly Cys Pro Trp Ser Arg Arg Pro Asp Gly Ser Val
100 105 110

Asn Val Arg Arg Phe Gly Gly Met Lys Ile Glu Arg Thr Trp Phe Ala
115 120 125

Ala Asp Lys Thr Gly Phe His Met Leu His Thr Leu Phe Gln Thr Ser
130 135 140

Leu Gln Phe Pro Gln Ile Gln Arg Phe Asp Glu His Phe Val Leu Asp
145 150 155 160

Ile Leu Val Asp Asp Gly His Val Arg Gly Leu Val Ala Met Asn Met
165 170 175

Met Glu Gly Thr Leu Val Gln Ile Arg Ala Asn Ala Val Val Met Ala
180 185 190

Thr Gly Gly Ala Gly Arg Val Tyr Arg Tyr Asn Thr Asn Gly Gly Ile
195 200 205

[0096]

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

[0097]

465	470	475	480
Ala Glu Leu Gln Glu Arg Phe Lys Arg Val Arg Ile Thr Asp Thr Ser	485	490	495
Ser Val Phe Asn Thr Asp Leu Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Gly His Gly	500	505	510
Leu Asn Val Ala Glu Cys Met Ala His Ser Ala Met Ala Arg Lys Glu	515	520	525
Ser Arg Gly Ala His Gln Arg Leu Asp Glu Gly Cys Thr Glu Arg Asp	530	535	540
Asp Val Asn Phe Leu Lys His Thr Leu Ala Phe Arg Asp Ala Asp Gly	545	550	555
Thr Thr Arg Leu Glu Tyr Ser Asp Val Lys Ile Thr Thr Leu Pro Pro	565	570	575
Ala Lys Arg Val Tyr Gly Gly Glu Ala Asp Ala Ala Asp Lys Ala Glu	580	585	590
Ala Ala Asn Lys Lys Glu Lys Ala Asn Gly	595	600	

<210> 91
 <211> 1809
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 91
 gtgcaaacct ttcaagccga tcttgccatt gtaggcgcgcg gtggcgcgagg attacgtgct 60
 gcaattgctg ccgcgcaggc aaatccgaat gcaaaaatcg cactaatctc aaaagtatac 120
 ccgatgcgta gccataccgt tgctgcagaa gggggctccg ccgctgtcgc gcaggatcat 180
 gacagcttcg aatatcaatt tcacgataca gtagcgggtg gcgactggtt gtgtgagcag 240
 gatgtcgtgg attatttcgt ccaccactgc ccaaccgaaa tgacccaact ggaactgttg 300
 ggatgcccat ggagccgtcg ccgggatggt agcgtcaacg tacgtcgctt cggcggcatg 360
 aaaatcgagc gcacctggtt cgccgcgat aagaccggct tccatatgct gcacacgtg 420
 ttccagacct ctcigcaatt cccgcagatc cagcgttttg acgaacattt cgtgctggat 480
 attctggttg atgatggtca tgttcgcggc ctggtagcaa tgaacatgat ggaaggcacg 540
 ctggtgcaga tccgtgctaa cgcggtcgtt atggctactg gcggtgcggg tcgctttat 600
 cgttacaaca ccaacggcgg catcgttacc ggtgacggta tgggtatggc gctaagccac 660
 ggcgllccgc tgcgtgacat ggaattcggt cagtatcacc caaccggtct gccaggttcc 720
 ggtatcctga tgaccgaagg ttgccgcggt gaaggcggta ttctggtcaa caaaatggc 780

[0098]

```

taccgttatac tgcaagatta cggcatgggc ccggaactc cgtgggcga gccgaaaaac      840
aaatatatgg aactgggtcc acgcgacaaa gtctctcagg cttcttgga cgaatggcgt      900
aaaggcaaca ccatctccac gccgcgtggc gatgtggttt atctcgactt gcgtcacctc      960
ggcgagaaaa aactgcatga acgtctgccg ttcattctcg aactggcgaa agcgtacgtt    1020
ggcgtcgatc cggttaaaga accgatcccg gtacgtccga ccgcacacta caccatgggc    1080
ggtatcgaaa ccgatcagaa ctgtgaaacc cgcattaaag gtctgttcgc cgtgggtgaa    1140
tgttctcttg ttggtctgca cgggtgaaac cgtctgggtt ctaactccct ggcggaactg    1200
gtggtcttcg gccgtctggc cgggtgaaca gcgacagagc gtgcagcaac tgccggtaat    1260
ggcaacgaag cggcaattga agcgcaggca gctggcggtg aacaacgtct gaaagatctg    1320
gttaaccagg atggcggcga aaactgggcg aagatccgcg acgaaatggg cctggctatg    1380
gaagaaggct gcggtatcta ccgtacccg gaactgatgc agaaaaccat cgacaagctg    1440
gcagagctgc aggaacgctt caagcgcgtg cgcattaccg acattccag cgtgttcaac    1500
accgacctgc tctacacat tgaactgggc cacggtctga acgttgctga atgtatggcg    1560
cactccgcaa tggcacgtaa agagtccegc ggcgcgcacc agcgtctgga cgaaggtgc    1620
accgagcgtg acgacgtcaa ctctctcaaa cacaccctcg ccttcgcga tgctgatggc    1680
acgactegcc tggagtacag cgacgtgaag attactacgc tgccgccagc taaacgcgtt    1740
tacgggtggc aagcggatgc agccgataag gcggaagcag ccaataagaa ggagaaggcg    1800
aatggctga                                     1809

```

<210> 92
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 92

```

Met Thr Thr Lys Arg Lys Pro Tyr Val Arg Pro Met Thr Ser Thr Trp
1          5          10          15

```

```

Trp Lys Lys Leu Pro Phe Tyr Arg Phe Tyr Met Leu Arg Glu Gly Thr
          20          25          30

```

```

Ala Val Pro Ala Val Trp Phe Ser Ile Glu Leu Ile Phe Gly Leu Phe
          35          40          45

```

```

Ala Leu Lys Asn Gly Pro Glu Ala Trp Ala Gly Phe Val Asp Phe Leu
50          55          60

```

```

Gln Asn Pro Val Ile Val Ile Ile Asn Leu Ile Thr Leu Ala Ala Ala
65          70          75          80

```

```

Leu Leu His Thr Lys Thr Trp Phe Glu Leu Ala Pro Lys Ala Ala Asn

```

[0099]

85	90	95
Ile Ile Val Lys Asp Glu Lys Met Gly Pro Glu Pro Ile Ile Lys Ser 100 105 110		
Leu Trp Ala Val Thr Val Val Ala Thr Ile Val Ile Leu Phe Val Ala 115 120 125		
Leu Tyr Trp 130		
<210> 93 <211> 396 <212> DNA <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)		
<400> 93 atgacgacta aacgtaaacc gtatgtacgg ccaatgacgt ccacctgggtg gaaaaaattg ccgtttttatc gctttttacat gctgcgcgaa ggcacggcgg ttccggctgt gtggttcagc attgaactga ttttcgggct gtttgccctg aaaaatggcc cggaagcctg ggcgggattc gtcgactttt tacaaaaccc ggttatcgtg atcattaacc tgatcactct ggcggcagct ctgctgcaca ccaaaacctg gtttgaactg gcaccgaaag cggccaatat cattgtaaaa gacgaaaaaa tgggaccaga gccaattatc aaaagtctct gggcggtaac tgtggttgcc accatcgtaa tcctgtttgt tgccctgtac tggtaa	60 120 180 240 300 360 396	
<210> 94 <211> 119 <212> PRT <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)		
<400> 94 Met Ile Asn Pro Asn Pro Lys Arg Ser Asp Glu Pro Val Phe Trp Gly 1 5 10 15 Leu Phe Gly Ala Gly Gly Met Trp Ser Ala Ile Ile Ala Pro Val Met 20 25 30 Ile Leu Leu Val Gly Ile Leu Leu Pro Leu Gly Leu Phe Pro Gly Asp 35 40 45 Ala Leu Ser Tyr Glu Arg Val Leu Ala Phe Ala Gln Ser Phe Ile Gly 50 55 60 Arg Val Phe Leu Phe Leu Met Ile Val Leu Pro Leu Trp Cys Gly Leu 65 70 75 80 His Arg Met His His Ala Met His Asp Leu Lys Ile His Val Pro Ala 85 90 95		

[0100]

Gly Lys Trp Val Phe Tyr Gly Leu Ala Ala Ile Leu Thr Val Val Thr
100 105 110

Leu Ile Gly Val Val Thr Ile
115

<210> 95

<211> 360

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 95

atgattaatc caaatccaaa gcgttctgac gaaccggtat tctggggcct cttcggggcc 60

ggtggtatgt ggagcgccat cattgcgcg gtgatgatcc tgctggtggg tattctgctg 120

ccactggggg tgtttccggg tgatgcgctg agctacgagc gcgttctggc gttcgcgcag 180

agcttcattg gtcgcgtatt cctgttcctg atgatcggtc tgccgctgtg gtgtggttta 240

caccgtatgc accacgcgat gcacgatctg aaaatccacg tacctgcggg caaatgggtt 300

ttctacggtc tggtgctat cctgacagtt gtcacgetga ttggtgtcgt tacaatctaa 360

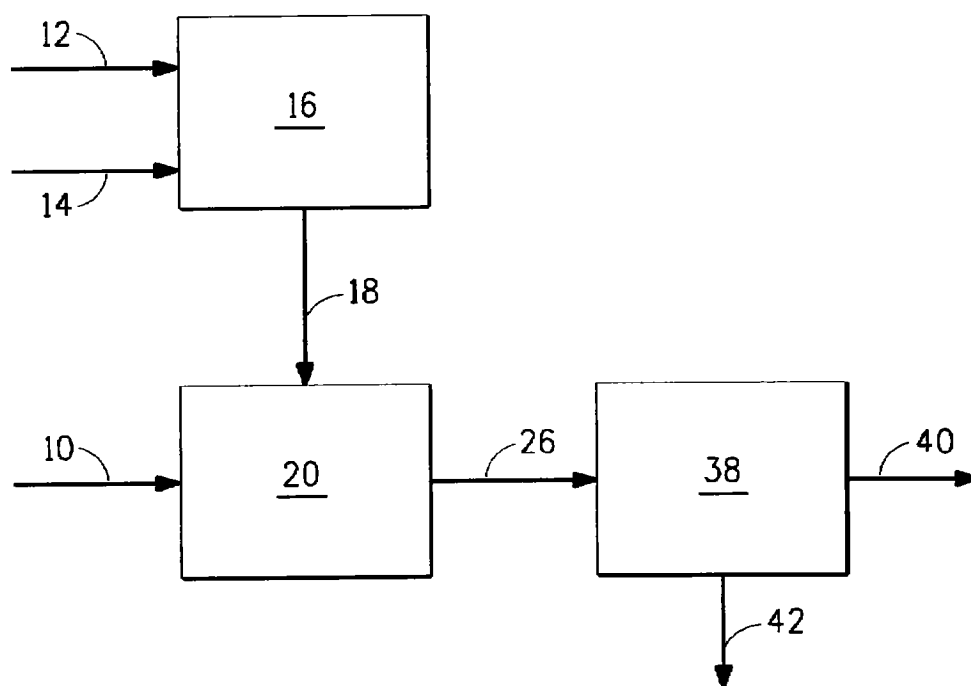


图 1

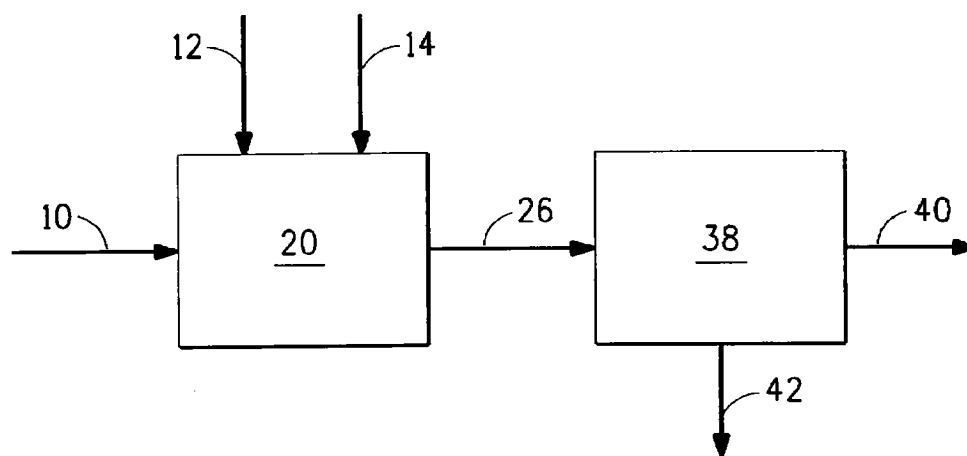


图 2

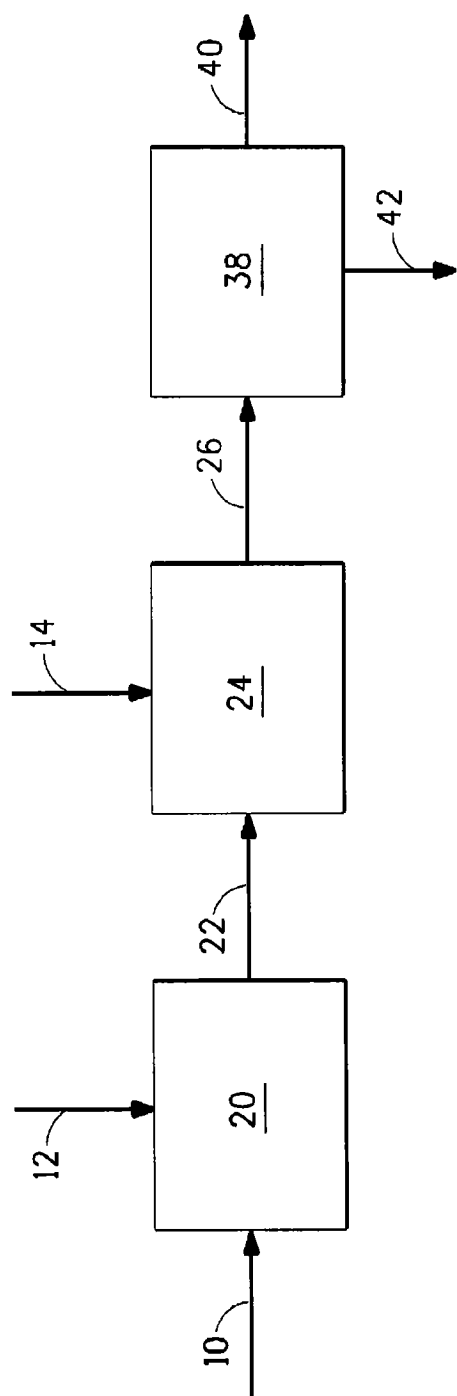


图 3

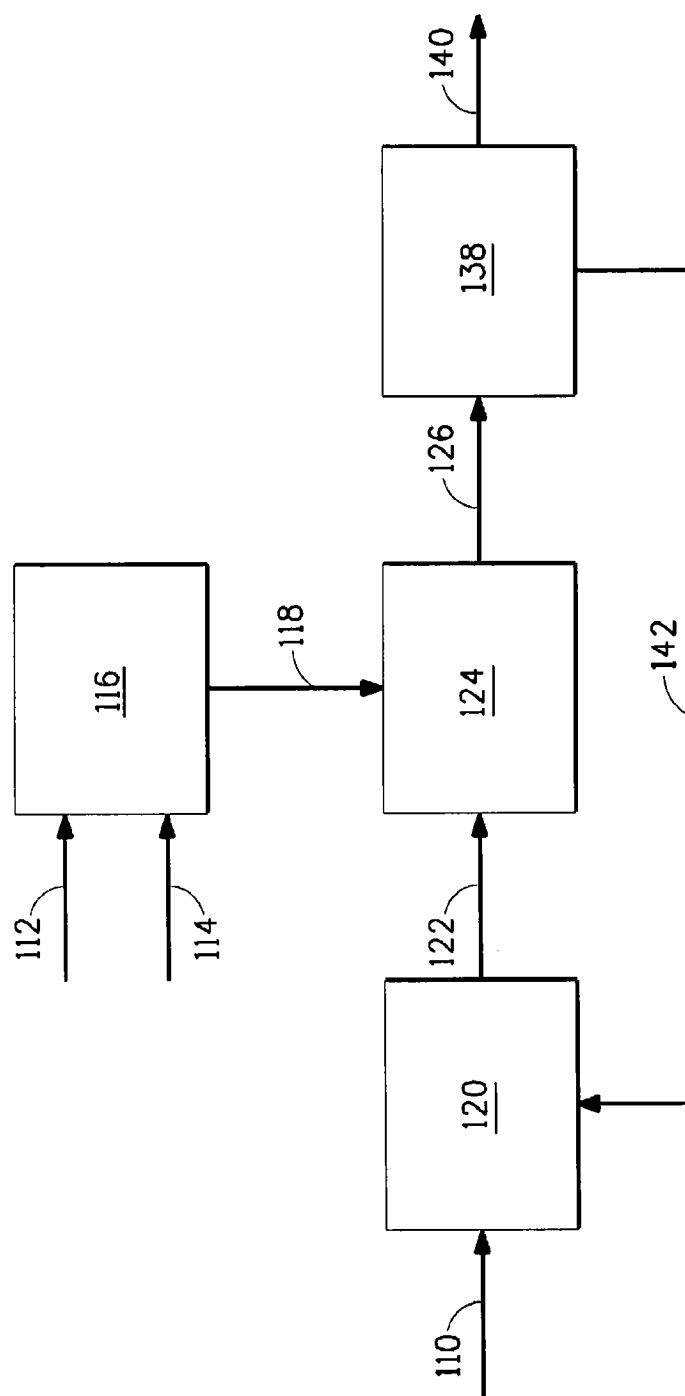


图 4

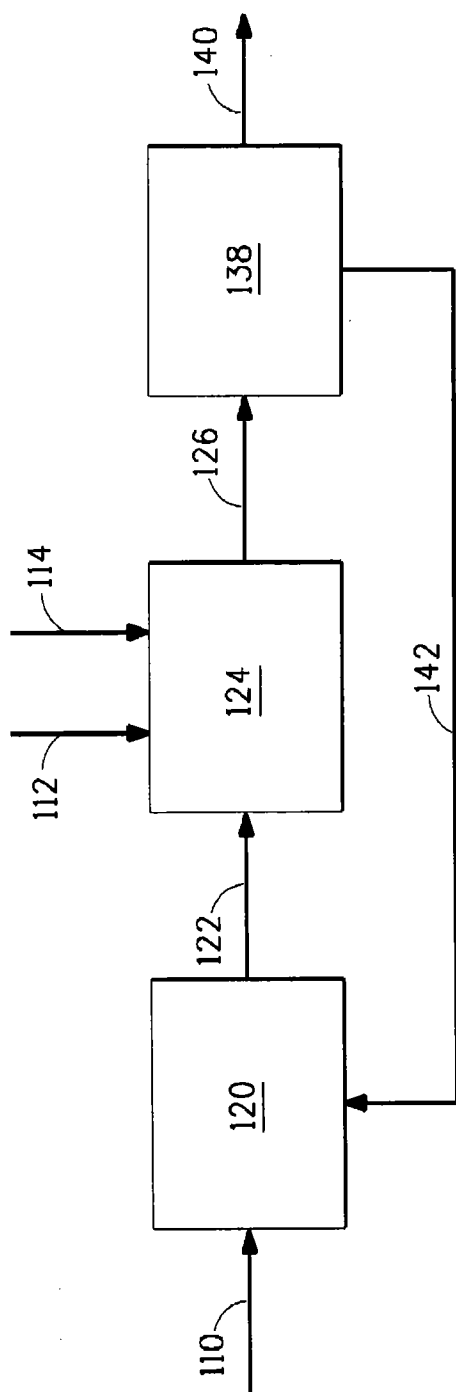


图 5

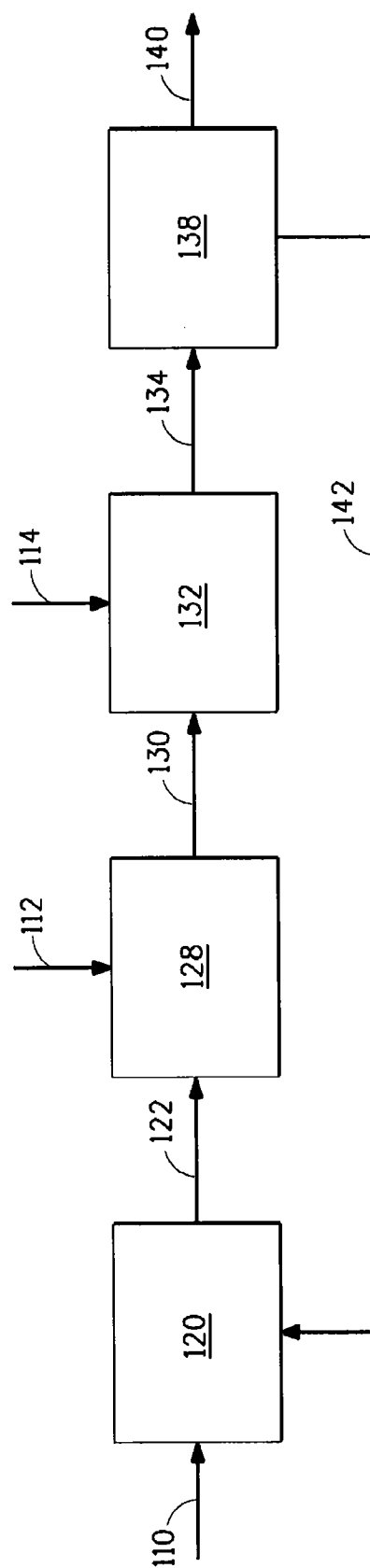


图 6

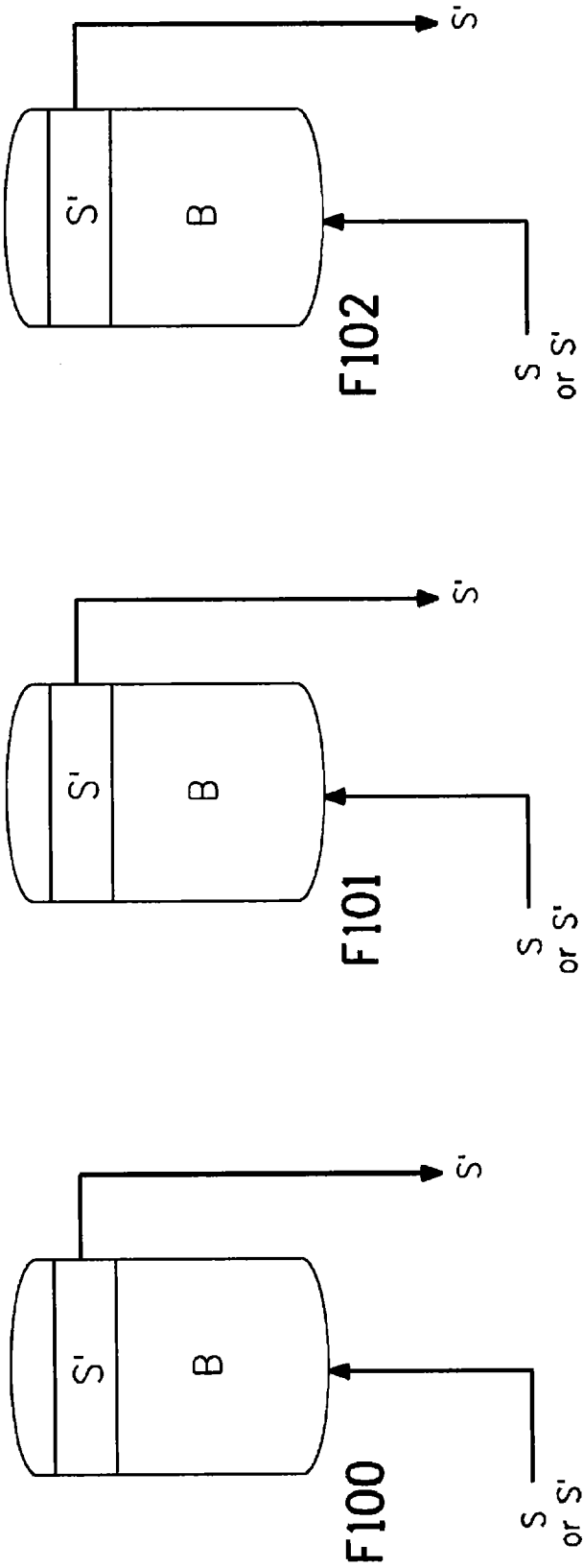


图 7