[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 9/88
C12N 1/19 C12N 15/60
C12N 15/63 C12P 7/00
C12G 3/06

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98106195.8

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1161463C

[22] 申请日 1998.2.6 [21] 申请号 98106195.8

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 7 [33] JP [31] 25026/1997

[71] 专利权人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 吾乡升志 菊池泰弘

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 陈文平

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 2 页

[54] 发明名称 阿魏酸脱羧酶

[57] 摘要

本发明涉及具有 SEQ ID NO：1 中所代表氨基酸序列的蛋白，或具有阿魏酸脱羧酶活性并具有 SEQ ID NO：1 所代表的氨基酸序列中有一个或更多个氨基酸残基被缺失、替代或添加而成的氨基酸序列的蛋白；编码所述蛋白的基因；包括所述基因的重组载体；带有所述重组载体的转化子；用于制备 4－乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸或蒸馏酒的方法，其中使用了具有阿魏酸脱羧酶活性并源自所述转化子的酶源；以及用于制备蒸馏酒的方法，其中使用了具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母。

ISSN1008-4274

1.具有 SEQ ID NO: 1 所代表的氨基酸序列的蛋白。

2.编码权利要求 1 蛋白的基因。

3.包括权利要求 2 基因的重组载体。

4.带有权利要求 3 重组载体的转化子。

5.权利要求 4 的转化子，其中该转化子是酵母。

6.用于制备 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸的方法，其包括将阿魏酸与源自权利要求 4 的转化子并具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源在水介质中接触，以在水介质中形成 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸，并从其中回收 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸。

7.根据权利要求 6 的方法，其中所述的酶源为根据权利要求 1 的蛋白，或根据权利要求 4 转化子的培养物、细胞或处理的细胞。

8.用于制备蒸馏酒的方法，其包括向酱醪中添加源自权利要求 4 的转化子的具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源。

9.根据权利要求 8 的方法，其中所述的酶源为根据权利要求 1 的蛋白，或权利要求 4 转化子的培养物、细胞或处理的细胞。

10.用于制备蒸馏酒的方法，其特征在于使用权利要求 5 的转化子。

11.通过以下方法可获得的蒸馏酒，包括向酱醪中添加具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源，该酶源源自带有包括以下蛋白之编码基因的重组载体的转化子: 具有 SEQ ID NO: 1 所代表氨基酸序列的蛋白。

12.通过权利要求 10 的方法可获得的蒸馏酒。

# 阿魏酸脱羧酶

本发明涉及用于通过使用其中已导入有阿魏酸脱羧酶基因的酶母制备具有优良口味的蒸馏酒的方法。

阿魏酸脱羧酶是催化阿魏酸脱羧形成4-乙烯愈创木酚的酶。

在酒类工业中,总是需要开发蒸馏酒如具有优良口味的shochu(一种日本蒸馏酒)、白酒(一种中国蒸馏酒)、威士忌、白兰地、伏特加、朗母酒(rum)、杜松子酒等。具有优良口味的蒸馏酒一般具有相对较高含量的4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸中的至少一种。

香子兰醛和香子兰酸通过4-乙烯愈创木酚的氧化而形成[Nippon Nogeikagaku Kaishi,70(6),684-686(1996)]。

已知具有优良口味的蒸馏酒可通过加入羟基肉桂酸酯水解酶或具有高羟基肉桂酸酯水解酶产率的日本曲霉(koji mold)[日本公开未审查的专利申请No.115957/95)或阿魏酸酯酶[Nippon Nogeikagaku Kaishi,70(6),684-686(1996)]以释放阿魏酸进入酱醪而制备。

阿魏酸以及肉桂酸和香豆酸为苯丙烯酸,并以酯的形式结合到含于半纤维素成分中阿拉伯糖基木聚糖的阿拉伯糖侧链上,半纤维素成分构成植物如谷类的细胞壁。

已有提出用于通过细胞融合制备具有高阿魏酸脱羧酶活性的酵母的方法[发酵和生物工程学会年会摘要,41(1995)]。然而,还不可能获得具有增加阿魏酸脱羧酶活性的酵母。因此,用这种酶母制备具有优良口味蒸馏酒的方法是未知的。

短小芽孢杆菌阿魏酸脱羧酶[应用环境微生物学.,61(1),326-332(1995)]和荧光假单胞菌[细菌学杂志.,176,5912-5918(1994)]已被分离和纯化。编码短小芽孢杆菌阿魏酸脱羧酶的基团(之后称为

FDC 基因）也是已知的。酵母属酵母的阿魏酸脱羧酶还未得到分离，尽管已认识到该酶活性的存在。

对于酿酒酵母，编码苯丙烯酸脱羧酶的基因（之后称 PAD1 基因）[基因，142，107-112（1994）]是已知的，但没有其 FDC 基因的报导。

本发明的目的是提供在制备具有优良口味的蒸馏酒中有用的阿魏酸脱羧酶。

本发明涉及具有 SEQ ID NO：1 所代表的氨基酸序列的蛋白，或具有阿魏酸脱羧酶活性并具有在 SEQ ID NO：1 氨基酸序列中有一个或更多个氨基酸残基被缺失、替代或添加的氨基酸序列的蛋白（之后称为本发明蛋白）；编码所述蛋白的基因（之后称为本发明基因）；包括所述基因的重组载体（之后称为本发明重组载体）；带有所述重组载体的转化子（之后称为本发明转化子）；用于制备 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸的方法，包括使阿魏酸在水性介质中与源自所述转化子并具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源接触以在水 性介质中形成 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸，并从其中回收 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸（之后称为本发明制备 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛，或香子兰酸的方法）；用于制备蒸馏酒的方法，包括向酱醪中添加源自所述转化子并具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源（之后称为通过用本发明蛋白制备蒸馏酒的方法）；以及用于制备蒸馏酒的方法，其特征在于使用了具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母（之后称为通过使用本发明酵母制备蒸馏酒的方法）。

本发明提供了通过用于制备蒸馏酒的上述方法而制备的蒸馏酒。

附图简述

图 1 显示了含有酵母 FDC1 基因 DNA 片段的限制性图谱和用于测定 FDC1 基因及所得 DNA 片段的 FDC 活性而进行的亚克隆结果。

图 2 说明了构建用于图 1 FDC1 基因表达质粒的步骤。

发明详述

本发明蛋白可以是具有这样氨基酸序列的蛋白，即只要其具有阿魏

酸脱羧酶活性，亦即催化阿魏酸脱羧作用以形成 4-乙烯愈创木酚的活性，在 SEQ ID NO： 1 所代表的氨基酸序列中缺失、替代或添加氨基酸残基而形成的序列。缺失、替代或添加的氨基酸残基数目没有特别的限制，但对于本领域的普通技术人员来说是众所周知的，通常在一到几十的范围内，优选一到十或更少。优选的氨基酸序列为那些用 DNASIS 3.0 版（Hitachi 软件工程公司）对全序列简单同源性分析时与 SEQ ID NO： 1 所代表的氨基酸序列显示出 20%或更多的同源性，尤其 40%或更多同源性的氨基酸序列。

如果提供了这里提供的信息，本领域普通的技术人员用根据下述商业上可得到的实验手册方法中用于遗传工程和生物工程基本技术可完成本发明基因的分离、所述基因核苷酸序列的测定、本发明重组载体和带有本发明重组载体转化子的制备以及本发明蛋白的制备，这些手册包括，如《基因手册》(Gene Manual)，Kodansha 公司；《基因操作实验方法》（Methods for Experiments in Gene Manipulation），Yasutaka Takagi 编,Kodansha 公司；《分子克隆》（Molecular Cloning），冷泉港实验室（1982）；《分子克隆》（Molecular Cloning），第 2 版，冷泉港实验室（1989）；《酶学方法》(Methods in Euzymol)，194（1991）；以及酵母的基因实验(Gene Experiments Using Yeasts)，日本 Yodosha 公司出版（1994）。

可用不具阿魏酸脱羧酶活性的酵母或具有很低阿魏酸脱羧酶活性的酵母（之后统称为基本不具有阿魏酸脱羧酶活性的酵母），如酿酒酵母 K9H14（之后称为 K9H14 菌株）分离赋予阿魏酸脱羧酶活性的本发明基因。即，可通过以带有 FDC 基因的酵母 DNA 文库转化 K9H14 菌株，并且从被赋予阿魏酸脱羧酶活性的转化酵母中获取 DNA 而分离 FDC 基因。

带有 FDC 基因的酵母 DNA 文库可通过以限制性酶切割具有阿魏酸脱羧酶活性的酵母（如酿酒酵母 W3（之后称为 W3 菌株），为一种酒酵母）的染色体 DNA 并将每个获得的 DNA 片段与能够维持于酵母中的载体连接而制备。

任何可切割染色体 DNA 的限制性酶可用于上面的方法。优选地，使用那些得到 10kbp 或更小 DNA 片段的限制性酶。染色体 DNA 可用限制性酶完全消化或部分消化。

能够维持于酵母中载体的实例有 YCp 载体、YEp 载体、YRp 载体、YIp 载体及 YAC（酵母人工染色体）载体。

DNA 文库对 K9H14 菌株的转化可根据遗传工程和生物工程中常用的方法完成，如原生质球方法[如美国科学院院报（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），75，1929-1933（1978）]，醋酸锂方法[如，细菌学杂志（J. Bacteriol.）.,153,163-168(1983)]以及电穿孔方法[如：酶学方法.,194，182-187（1991）]。

被赋予阿魏酸脱羧酶活性的酵母可，例如，用下面的方式加以筛选。

通过上面方法获得的转化子于 YPD 液体培养基（1%酵母提取物、2%蛋白胨及2%葡萄糖)中培养过夜（20-24 小时)。向每个 0.9ml 的所得培养物中加入 0.1ml 1g/l 的阿魏酸溶液，接着培养 20-24 小时。培养完成后，通过感官筛选具有烟味的培养物，接着通过高效液相色谱[Nippon Nogeikagaku Kaishi,69, 1587-1596（1995）]以进一步筛选出其中可检测到 4-乙烯愈创木酚的培养物。从这样筛选出的培养物中分离转化子，从而筛选到被赋予阿魏酸脱羧酶活性的酵母。

作为阿魏酸，也可用反式阿魏酸或顺式阿魏酸。然而，优选使用反式阿魏酸。

从被赋予阿魏酸脱羧酶活性的酵母中回收质粒并且用该质粒转化大肠杆菌可根据遗传工程中一般所用的方法加以完成。例如，质粒可通过用在《酵母的基因实验》中所述的方法（《实验药物》增刊），Yodosha 公司（1994）从酵母中回收，且转化可通过《分子克隆》第二版，冷泉港实验室（1989）中描述的方法完成。

通过上面方法筛选的 DNA 克隆以适当的限制性酶切割并将获得的 DNA 片段用双脱氧方法等进行核苷酸序列分析，从而可测定 FDC 基因的核苷酸序列。从酵母基因组工程的结果[如，互联网

http://genome-www.stanford.edu/sacchdb/]可获得源自 W3 菌株的 FDC 基因核苷酸序列。

以这种方式测定的 FDC 基因核苷酸序列的实例为由 SEQ ID NO：1 所代表的序列。

一旦确定由 SEQ ID NO：1 所代表的核苷酸序列编码阿魏酸脱羧酶，本发明基因可通过化学合成、PCR（聚合酶链式反应）或用具有所述核苷酸序列的 DNA 片段作为探针的杂交来获得。

本发明的基因包括通过用上述方法制备的基因中部分核苷酸序列的人工缺失、替代或添加而获得的修饰基因。每种氨基酸密码子的选择可根据人为基础，例如，通过参照使用宿主的密码子使用[如，核酸研究（Nucleic Acids Res.）.,9，43-74（1981）]加以完成。

适当替代用于重组子载体制备的本发明基因核苷酸序列中的碱基以便得到最适于在宿主细胞中表达该基因的密码子。核苷酸序列的修饰也可根据如定点诱变方法[如美国自然科学院报，81，5662-5666（1984）]加以完成。

基因断裂、表达调节及表达水平的改变可通过用，例如《酶学方法》，194，594-597（1991）所述方法作用于本发明基因。

本发明的重组载体可通过用限制性酶等制备包括本发明基因的 DNA 片段并在位于启动子下游的插入位点将该 DNA 片段插入表达载体而获得。本发明转化子可通过将本发明的重组载体导入适于上面提到的表达载体的宿主细胞而获得。

在本发明重组载体中，转录终止序列对本发明基因的表达不是关键的，但转录终止序列恰恰位于结构基因下游是优选的。

作为宿主细胞，可使用能表达上面基因的任何细胞。合适宿主细胞的实例为属于以下属的细菌细胞，包括埃希氏杆菌属、沙雷氏菌属、棒杆菌属、短杆菌属、假单胞菌属或芽孢杆菌属（如，大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、黄色短杆菌、乳酸发酵短杆菌、谷氨酸棒杆菌及嗜氨微杆菌），酵母细胞如酿酒酵母、粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyes pombe)，乳酸克鲁维酵母，出芽丝孢酵母及

Schwanniomyces alluvius，动物细胞如Namalwa细胞，COS细胞及CHO细胞，及植物细胞如烟草细胞和胡萝卜细胞。

作为表达载体，使用了能在上面细胞中自主复制或整合到其染色体上并包括用于本发明基因核苷酸序列转录位于合适位点的启动子的载体。

当用细菌细胞如大肠杆菌作为宿主细胞时，优选使用本发明的重组载体，其能够在所用的细胞中自主复制并且包括启动子、核糖体结合序列、本发明DNA及转录终止序列。载体可进一步包括调节启动子的基因。

适当表达载体的实例有pBTrp2、pBTac1及pBTac2（Boehringer Mannheim产品）、pKYP200[农业生物化学(Agric Bid Chem.),48，669-675（1984）]、pLSA1[农业生物化学.,53，2771（1989）]、pGEL1[美国自然科学院院报，82，4306（1985）]及pBluescript（Stratagene产品）。

作为启动子，可使用能在宿主细胞，如大肠杆菌中表达的任何启动子。例如，可以使用源自大肠杆菌或噬菌体的启动子，如trp启动子（Ptrp）、lac启动（Plac）、$P_L$启动子及$P_R$启动子。也可使用人工修饰的启动子如其中的两个PtrpS串联结合的（Ptrp × 2）的启动子及tac启动子。

作为核糖体结合序列，可使用能够在宿主细胞如大肠杆菌中表达的任何核糖体结合序列。将核糖体结合序列和起始密码子之间的距离调整到适当的长度（如6-18个碱基）是优选的。

通过任何一个用于将DNA导入细菌细胞的方法，例如，用钙离子的方法[美国自然科学院报，69，2110-2114（1972）]及原生质体方法（日本公开的未审查的专利申请No.2483942/88）完成重组载体向细菌细胞的导入。

当酵母细胞用作宿主细胞时，YEp13（ATCC 37115）、YEp24（ATCC 37051）、YCp50（ATCC 37419）等可用作表达载体。

作为启动子，可使用能在酵母细胞中表达的任何启动子。合适启动

子的实例有在糖酵解途经中的基因启动子如己糖激酶基因启动子、gal1 启动子、gal10 启动子、热休克蛋白启动子、MF α 1 启动子及 CUP1 启动子。

通过用于将 DNA 导入酵母细胞的任何一种方法，例如，电穿孔方法[酶学方法.,194,182-187(1990)]、原生质球方法[美国自然科学院院报，84，1929-1933（1978）]及醋酸锂方法[细菌学杂志.,153，163-168（1983）完成重组载体向酵母细胞中的导入。

当动物细胞用作宿主细胞时，pcDNAI/Amp、pcDNAI 及 pcDM8（日本 Funakoshi 公司产品）可用作表达载体。作为启动子，可以使用能够在动物细胞中表达的任何启动子。合适启动子的实例有人类 CMV IE（立即早期）基因的启动子。人类 CMV IE 基因的增强子可与该启动子结合使用。

可用任何一种用于将 DNA 导入动物细胞的方法，例如，电穿孔方法[细胞技术（Cytotechnology），3，133(1990)]、磷酸钙方法（日本公开未审查的专利申请 No.227075/90）、及脂质体转染方法[美国自然科学院院报，84，7413（1987）]完成重组载体向动物细胞的导入，

当植物细胞用作宿主细胞时，pBI121[核酸研究.,12，8771-8721（1984）]等可用作表达载体。作为启动子，可以使用能在植物细胞中表达的任何启动子。合适启动子的实例有花椰菜花叶病毒的 35S 启动子。

通过用于将 DNA 导入植物细胞的任何一种方法，例如，根癌农杆菌方法[酶学方法.,118，627-640（1986）]、粒子轰击方法[植物分子生物学（Plant Molecular Biology），11，433-439（1989）]及原生质体方法[自然，319，791-793（1986）]可完成重组子载体向植物细胞的导入。

本发明转化子用于制备本发明蛋白和制备调味剂如 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛及香子兰酸。此外，通过用酵母细胞作为宿主细胞而制备的本发明转化子优选用于制备具有优良口味的蒸馏酒。

本发明蛋白可通过以下方法制备，包括在培养基中培养本发明的转化子，允许本发明蛋白在培养物中积累且从培养物中回收蛋白。本发明转化子的培养可通过用于培养转化子宿主细胞的常规方法加以完成。

对于培养通过用微生物细胞如大肠杆菌细胞和酵母细胞作为宿主细胞而制备的转化子，只要其是含有可被所用微生物吸收的碳源、氮源、无机盐等的适于有效培养转化子的培养基，可使用天然或合成培养基。

用于微生物细胞碳源的实例包括碳水化合物如葡萄糖、果糖、蔗糖、糖蜜、淀粉及淀粉水解物；有机酸如醋酸和丙酸；以及醇如乙醇和丙醇。

作为微生物细胞的氮源，可使用氨、无机或有机酸铵盐如氯化铵、硫酸铵、酯酸铵及磷酸铵和其它含氮化合物以及蛋白胨、肉类提取物、酵母提取物、玉米浸液、酪蛋白水解物、大豆饼、大豆饼水解物及各种发酵细胞及其消化产物。

用于微生物细胞的无机物质实例包括磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸镁、硫酸镁、氯化镁、硫酸铁、硫酸锰、硫酸铜及碳酸钙。

转化的微生物细胞的培养通常在有氧条件下，例如，通过在15-40℃振荡培养或浸没通气搅拌培养16-96小时而完成。培养期间PH维持在3.0-9.0。如果必要，可向培养基中加入抗生素如氨苄青霉素和四环素。

当培养以包括可诱导启动子表达载体转化的微生物时，如果必要，可向培养基中加入诱导物。例如，在以包括lac启动子表达载体转化的微生物情况中，可向培养基中加入异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷（IPTG）等；在以包括trp启动子的表达载体转化的微生物情况中，可加入吲哚丙烯酸（IAA）等。

对于培养通过用动物细胞作为宿主细胞而制备的转化子，只要其是含有可被动物细胞吸收的碳源、氮源、无机盐等的且适于有效培养转化子的培养基，可使用天然培养基或合成培养基。合适培养基的实例

有 PRMI1640 培养基、Eagle 氏 MEM 培养基及通过向这些培养基中加入胎牛血清等而制备的培养基。

微生物细胞的培养通常在 5%$CO_2$ 存在时培养 3-7 天。如果必要，可向培养基中加入卡那霉素和青霉素。

对于培养通过用植物细胞作为宿主细胞而制备的转化子，只要其是含有可被植物细胞吸收的碳源、氮源、无机盐等的且适于有效培养转化子的培养基，可使用天然培养基或合成培养基。合适培养基的实例有 Murashige-Skoog(MS)培养基及 White 培养基。

植物细胞的培养通常在有氧条件下进行，例如，通过于 15-40 ℃振荡培养或浸没通气搅拌培养 1-30 天。培养期间 PH 维持在 3.0-9.0 。如果必要，可向培养基中加入抗生素如卡那霉素及青霉素。

培养完成以后，可根据用于分离和纯化酶的一般方法分离和纯化在本发明转化子细胞内部或外部产生的本发明蛋白。当该蛋白在细胞内产生时，可以下面的方式进行分离和纯化。通过离心从培养物中分离细胞并清洗，接着用超声破碎机、弗氏压碎器、Manton Gaulin 匀浆器、Dyno Mill 等破碎以获得无细胞提取物。离心无细胞提取物，并且将获得的上清以硫酸铵等盐析析出，用二乙氨乙基（DEAE）-琼脂糖等进行阴离子交换层析，用丁基琼脂糖，苯基琼脂糖等进行疏水层析，用分子筛进行凝胶过滤，电泳如等电聚焦等电泳，从而获得纯化的本发明蛋白的酶制品。当该蛋白在细胞外产生时，用与上面处理无细胞提取物相同的方式处理培养物。

源自待用于制备本发明 4-乙烯愈创木酚、香子兰醛或香子兰酸方法中的本发明转化子并具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源，包括通过上述方法而获得的部分或高度纯化的本发明蛋白、以及本发明转化子的培养物、细胞及处理的细胞。处理细胞的实例包括被物理化学或生物化学处理的细胞，如清洗的细胞，冻干的细胞及丙酮处理的细胞。

酶源通常以 0.1-1000 单位阿魏酸脱羧酶/ml 水介质的浓度使用。阿魏酸脱羧酶的量以单位表示，一个单位定义为通过用阿魏酸作为底物在 50mM 磷酸缓冲液（PH5.0）中于 30 ℃反应 1 小时而产生 1nmol4-

乙烯愈创木酚的酶量。阿魏酸在水介质中用0.01-10g/l的浓度。

当培养物或细胞用作酶源时，培养物或细胞悬液可以用表面活性剂如十六烷基氯化吡啶镒或十六烷基三乙基溴化铵，或用有机溶剂如甲苯或二甲苯处理。表面活性剂或有机溶剂分别以0.05-1.0%（w/v）或1-20%（v/v）的量加入。

反应通常在20-60℃ PH2.5-10.0时进行1-72小时，尽管这些条件根据培养物的量、细胞或处理的细胞以及阿魏酸的量而改变。

通过上面的反应，4-乙烯愈创木酚在水介质中形成。反应完成后，如果必要，破碎培养物、细胞、处理的细胞等。然后，通过如离心手段从水介质中去除沉淀物，并将获得的上清进行普通的纯化步骤如提取、蒸馏、各种层析及重结晶，由此可分离和纯化4-乙烯愈创木酚。

香子兰醛或香子兰酸可通过氧化水介质中的4-乙烯愈创木酚而获得，或者4-乙烯愈创木酚可通过如强制通气手段或通过使用微生物如枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒杆菌细胞[工业微生物杂志（J. Ind. Microbiol），15，457-471（1995）]从水介质中得到分离和纯化。

香子兰醛或香子兰酸的分离和纯化可用与分离和纯化4-乙烯愈创木酚相同的方式进行。

根据用本发明蛋白制备蒸馏酒的方法，蒸馏酒可用与用于制备蒸馏酒的常规方法相同的方式获得，除了源自本发明转化子并具有阿魏酸脱羧酶活性的酶源以0.1-50单位/ml的浓度加入到酱醪中作为阿魏酸脱羧酶的酶量之外，其包括用日本酒曲霉或糖化酶对碳源的糖化作用，通过添加酵母而导致的乙醇发酵及蒸馏。酱醪意指经乙醇发酵而获得的培养物。蒸馏酒意指通过蒸馏这样的酱醪或以压力过滤或离心处理后的酱醪而获得的含乙醇的酒。

根据通过用本发明酵母制备蒸馏酒的方法，蒸馏酒可用与用于制备蒸馏酒的常规方法相同的方式而获得，除了使用了具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母，其包括用日本酒曲霉或糖化酶对碳源的糖化作用，通过加入酵母所致的乙醇发酵及蒸馏。

术语“具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母”意指用酵母菌株作为

宿主细胞或亲本菌株经重组DNA技术或突变技术而获得并较用作宿主细胞或亲本菌株的酵母菌株具有更高的阿魏酸脱羧酶活性的酵母。

例如，具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母可通过重组 DNA 技术以下面的方式制备。包括编码阿魏酸脱羧酶基因（如，本发明基因，和短小芽孢杆菌的 FDC 基因）的重组载体通过上面的方法制备，并且宿主细胞用重组载体通过上面的方法加以转化，从而可获得所需的酵母。

具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母也可通过突变技术以下面的方式制备。将亲本菌株通过常规方法，例如，紫外照射和用诱变剂如甲磺酸乙酯及 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基脲处理而进行突变处理。通过与上述筛选被赋予阿魏酸脱羧酶活性的酵母相同的方法，从获得的突变体中筛选出与亲本菌株相比具有增强的 4-乙烯愈创木酚产率的菌株，从而可获得所需的酵母。此外，具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母可通过以下方法有效地制备，包括在含有使亲本菌株不能有效生长的苯丙烯酸浓度的培养基，例如，含有 1mM 或更多阿魏酸的培养基中培养按上述获得的突变体，然后筛选出较亲本菌株显示出更显著生长的突变体。

适于用于制备蒸馏酒的任何酵母可用作制备具有增强的阿魏酸脱羧酶活性酵母的宿主细胞或亲本菌株。优选地，使用酵母属的酵母，且更为优选地，使用属于酿酒酵母的酵母。特别地，使用基本不具有阿魏酸脱羧酶活性的酿酒酵母，如，日本酿造协会的 No.7 酵母、日本酿造协会的 No.9 酵母及 K9H14 菌株（sake 和 shochu 酵母）、IFO2112、IFO2114 及 IFO2115（威士忌酵母）作为宿主细胞得到显著的效果。

本发明酵母可用具有基本上没有阿魏酸脱羧酶活性的酵母作为宿主细胞以下面的方式加以制备。转化子通过类似于制备本发明转化子的方法制备，并将阿魏酸加入其中作为底物。4-乙烯愈创木酚用感官或高效液相色谱等定量检测以筛选出确实有 4-乙烯愈创木酚的形成的菌株，从而可获得所需的酵母。

通过上面方法制备的本发明酵母的实例有酿酒酵母YSA7（之后称为YSA7菌株）。此菌株于1996年12月11日，根据布达佩斯条约，以入藏号FERM BP-5772保藏于通商产业省工业科技处，国家生物科学和人类技术研究所（1-3， Higashi 1-chome,Tsukwoa-shi,Ibaraki-ken，日本）。

下面的测试实施例显示YSA7菌株是具有增强的阿魏酸脱羧酶活性的酵母。

检测实施例1 阿魏酸脱羧酶活性检测

对YSA7菌株、K9H14菌株（YSA7菌株的亲本菌株）及K9H14-C菌株（通过将YEp24导入K9H14菌株而制备的转化子）进行检测。将每种菌株的一接菌环接种到检测管中10mlYPD培养基中，并于30℃振荡培养22小时。向0.9ml得到的培养物中加入0.1ml 1g/l的阿魏酸溶液，接着于25℃静止培养22小时。培养完成后，培养液上清中的4-乙烯愈创木酚的含量通过在下面条件下的高效液相色谱测定。

柱体： Wakosil 5C 18-200 （i.d. 4.6 × 250mm）

柱体温度： 50℃

流动相： 10mM磷酸盐缓冲液（pH 2.5）/甲醇=50/50 （v/v）

检测器： 荧光检测器（Ex 280nm, Em 320nm）

上样： 培养上清用流动相稀释10倍且将10μl稀释液加入柱体中。

结果显示于表1中。

表1

| 菌株 | 形成4-乙烯愈创木酚的量 |
|---|---|
| YSA7菌株 | 4.88 |
| K9H14菌株 | 痕量 |
| K9H14-C菌株 | 痕量 |

用具有增强的阿魏酸脱羧酶活性由上面方法制备的酵母制备本发明蒸馏酒的方法描述如下。

作为碳源，可使用任何不含纤维的碳水化合物和淀粉。优选的碳源

有谷类如水稻、大麦、小米、玉米、高粱、日本黍（millet）及黍、土豆、荞麦、水果如葡萄和苹果及其酒曲。特别优选的为谷类及其酒曲。

作为酒曲霉，可以使用用于制备水稻酒曲、大麦酒曲、糠酒曲等的丝状真菌，如属于曲霉属或根霉属的微生物。酒曲意指用上述酒曲霉霉变的碳源。

作为糖化酶，可以使用含于麦芽中的酶、由酒曲霉产生的酶、酶制品如α-淀粉酶，葡糖淀粉酶及蛋白酶等。

乙醇发酵可以以，例如，下面的方式完成。当使用谷物时，发酵通过平行复合发酵进行，其中为淀粉的谷物用糖化酶降解成糖，然后加入酵母以产生发酵。例如，在制备 shochu 中，原料一般通过第一次加入和第二次加入而分批加入；即，酒曲在发酵开始时加入，在发酵过程中，将碳源的剩余部分加入。对于威士忌的制备，一般使用这样的方法，即其中的麦芽通过加入温水而糖化并且将获得的麦芽浆发酵。当使用非纤维性碳水化合物如水果、糖蜜和葡萄糖时，发酵通过简单的发酵进行，其中的酵母直接加入到碳源中以产生发酵。

通常，乙醇发酵在 5-25 ℃的温度 PH3.5-5.0 时进行，并且加入原料后的发酵时间对于 shochu 为 7-14 天，对于威士忌为 3-4 天，且对于白兰地为 7-14 天。

乙醇发酵完成后，如果必要，将获得的酱醪进行压力过滤或离心以去除发酵残渣及酵母细胞。将这样的酱醪或得到的过滤物或上清蒸馏以提高乙醇浓度，由此获得粗酒。作为选择，可在压力过滤或离心前将酒精加入酱醪以获得粗酒。粗酒直接或经如混合、稀释且加入酒精后的处理而制成含酒精的饮料形式。

本发明的一些实施方案在下面的实施例中加以说明。

实施例 1　编码阿魏酸脱羧酶基因的克隆

（1）赋予 K9H14 菌株的 ura3 突变

K9H14 菌株，一种日本酿造协会的 No.9 酿酒酵母单倍体菌株[一种日本酿造协会的 sake(shochu)酵母]且基本没有阿魏酸脱羧酶活性，

根据 Boeke 等的方法[分子普通遗传（Mol. Gen. Genet.），197，345-346（1984）]赋予其用作导入质粒标记的 ura3 突变。即，将 K9H14 菌株的一接种环量接种到 YPD 培养基并于 30℃振荡培养过夜。将得到的培养物（100μl）涂布于 FOA 平板[0.67%酵母氮基（Nitrogen Base）w/o 氨基酸（Difco 实验室公司），0.1%5-氟代乳清酸，0.005%的尿嘧啶，2%的葡萄糖及 2%的琼脂]，并于 30℃培养 3 天。从培养形成的菌落中筛选具有尿嘧啶需求并且没有阿魏酸脱羧酶活性的菌株，其由以带有 URA3 标记的质粒 YCp50 的转化而得到补充。该菌株称为 K9H14-3u 菌株。K9H14-3u 菌株在特性如发酵能力上与 K9H14 菌株相同。

（2）克隆

将 W3 菌株（酒酵母）的染色体 DNA 以 Bam HI 部分消化，并将获得的 DNA 片段插入到质粒 YCp50 的 Bam HI 位点以制备基因文库。K9H14-3u 菌株用基因文库转化，接着筛选出无尿嘧啶需求的转化子。将获得的转化子于 YPD 培养基中在 30℃振荡培养过夜。向 0.9ml 的每份所得培养物中加入 0.1ml 的 1g/l 阿魏酸溶液，接着于 25℃静止培养 22 小时。培养完成后，用感官筛选具有浓烟味的培养物，并将培养上清进行高效液相色谱，从而确证 4-乙烯愈创木酚的形成。

从这样筛选的培养物之一获得的菌株作为被赋予阿魏酸脱羧酶活性的菌株被分离。从该菌株中提取重组质粒 pSA11。

重组质粒 pSA11 带有约 4kbp 的插入 BamHI-BamHI 片段。此质粒用各种限制性酶切割并通过电泳分离获得的 DNA 片段，接着测量分子量以制备显示于图 1 的限制性图谱。

（3）核苷酸序列的测定

插入到质粒 pSA11 中的 4kbp BamHI-BamHI DNA 片段的核苷酸序列用 DNA 测序仪（PharmaciaLKB，ALF DNA 测序仪 II）通过双脱氧方法测定。结果，测定出显示于 SEQ ID NO：2 中的核苷酸序列，其包括具有显示于 SEQ ID NO：1 中核苷酸序列的基因（之后称为 FDC1 基因）作为开放阅读框。由 FDC 基因编码的从测定的核苷酸

序列推导的蛋白由503个氨基酸残基所组成。显示于SEQ ID NO：1中的此核苷酸序列发现与位于酵母基因组工程[如，互联网，http://genome-www.stanford.edu/sacchdb/]发表的核苷酸序列中No.IV染色体序列中位于1512140-1513651的序列一致。用DNASIS 3.0版（Hitachi软件工程公司）对FDC1基因、短芽孢杆菌（Bacillus pumilus）的FDC基因[应用环境微生物学（Appl. Environ Microbid.）,61，4484-4486（1995）]及编码酿酒酵母苯丙烯酸脱羧酶的基因（之后称为PAD1基因）[基因，142，107-112（1994）]作了简单的同源性分析。结果，对于全核苷酸序列，FDC1基因与上面2种基因分别仅显示30%和41%的同源性，且对于由该核苷酸序列翻译的全氨基酸序列仅显示11.25%和10.37%的同源性。此外，通过BLAST方法的同源性检索[利用基因组网数据库，Kyoritsu shuppan公司（1996）]显示FDC1基因对短小芽孢杆菌（Bacillus pumilus）的FDC基因和PAD1基因中的任何一个都没有显著的同源性。

实施例2 被赋予阿魏酸脱羧酶活性的shochu酵母的制备

（1）构建用于FDC基因表达的质粒

将约5μg pSA11质粒DNA溶于20ul H缓冲液[50mM Tris盐酸缓冲液（PH7.5），10mM氯化镁，1mM二硫苏糖醇及100mM氯化钠]中，并向其中加入10单位每种限制性酶BamH和SalI。于37℃反应过夜，接着通过0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离反应产物。将含有约3.6kbp DNA片段带的凝胶部分切出，并且用GENECLEAN II试剂盒（Bio101公司）提取和纯化该片段。除了使用酵母-大肠杆菌穿梭载体YEp24替代质粒pSA11外，重复与上面相同的步骤，从而提取和纯化约7.7kbp的DNA片段。用连接试剂盒（Takara shuzo公司）将约3.6kbp源自质粒pSA11的DNA片段（1ug）与约7.7kbp源自YEp24的DNA片段（0.1ug）于16℃进行连接反应过夜。反应混合物（5ul）用于转化感受态大肠杆菌JM109菌株（Toyobo公司）。将获得的转化子涂布于氨苄青霉素LB琼脂培养基上[1% Bacto-胰蛋白胨（Difco实验室公司），0.5%酵母提取物，1%氯化钠，1.5%琼脂及50ug/ml

的氨苄青霉素]并于37℃培养20小时。培养完成后，分离和培养形成的菌落，并从培养物中提取和纯化质粒DNA。将获得的质粒以限制酶BamHI和SalI切割，并发现它们中有一个具有约3.6kbp的DNA片段并命名为表达质粒pSA8（图2）。

（2）FDC1基因向Shochu酵母的导入及其表达

将K9H14-3u菌株接种到锥形烧瓶中的100ml YPD培养基中，并于30℃振荡培养直到细胞浓度达到2-4 × $10^7$细胞/毫升。培养完成后，离心（2500rpm，5分钟）收集细胞，然后通过醋酸锂方法将其与质粒pSA8接触。将与质粒pSA8接触的K9H14-3u菌株接种到SD琼脂培养基中（0.67%酵母氮基w/o氨基酸，2%葡萄糖及2%琼脂），并于30℃培养2-5天。培养完成后，从形成的一个菌落中获得YSA7菌株作为其中的K9H14-3u菌株的尿嘧啶需求被补充的转化子。

将YSA7菌株、K9H14菌株及K9H14-C菌株分别接种到YPD培养基并于30℃培养过夜。向0.9ml每份所得到的培养物中加入0.1ml 1g/l的阿魏酸溶液，接着于25℃静止培养22小时。培养完成后，培养上清中的4-乙烯愈创木酚含量通过高效液相色谱加以测定。确证了4-乙烯愈创木酚在YSA7菌株培养物中的形成，而几乎没有观察到4-乙烯愈创木酚在K9H14菌株和K9H14-C菌株培养物中形成。

实施例3　　水稻shochu的制备

用YSA7菌株、K9H14菌株和K9H14-C菌株及总840g水稻通过小规模酿造而制备水稻shochu。原料比例显示于表2中。

表2

| | 第一次加入 | 第二次加入 | 总计 |
|---|---|---|---|
| 总水稻（g） | 280 | 560 | 840 |
| 蒸过的水稻（g） | 280 | - | 280 |
| 水稻日本曲（g） | - | 560 | 560 |
| 水（ml） | 400 | 800 | 1200 |

第2次加入原料后，乙醇发酵于20℃进行10天，并将得到的酱醪蒸馏以获得水稻shochu。

根据日本税务处（the National Tax Administration Agency of Japan）的官方分析方法分析制备的 shochu。获得的每种 shochu 的乙醇含量和 4-乙烯愈创木酚的含量通过高效液相色谱加以测定，并通过 7 个成员作灵敏度估计。

结果显示于表 3。感官评估结果通过 7 个平行实验的平均数表示。

表 3

| | YSA7 菌株 | K9H14 菌株 | K9H14-C 菌株 |
|---|---|---|---|
| 乙醇（%） | 34.6 | 34.6 | 34.6 |
| 4VG（ppm） | 2.0 | 0.8 | 0.8 |
| 感官评估* | 2.5 | 3.0 | 3.0 |

*用 5 点标准评估（1：好，5：坏）

如表 3 所示，与用其亲本菌株 K9H14 菌株制备的水稻 shochu 相比，用 YSA7 菌株制备的水稻 shochu 具有显著高的 4-乙烯愈创木酚含量，并且通过感官评估也发现其具有特征性的口味。

序列表

（1）一般信息:

(i)申请人:

(A)名称: Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.

(B)街道: 1－6－1, Ohtemachi

(C)城市: Chiyoda-ku, Tokyo

(E)国家: 日本

(F)邮编: 100－8185

(G)电话: 03 3282－0036

(H)传真: 03 3282－1527

(I)电传: J24543HKKYOMA

(ii)发明名称: 阿魏酸脱羧酶

(iii)序列数: 002

(iv)计算机可读形式:

(A)媒介类型: 软盘－3.5英寸, 720Kb容量

(B)计算机: IBM PS/V

(C)操作系统: MS－DOS Ver3.30

(D)软件: PATENT AID Ver1.0

(v)优先申请资料:

(A)申请号: JP025026/97

(B)申请日: 1997年2月7日

（2）SEQ ID NO: 1的信息:

(i)序列特征:

(A)长度： 1512 碱基
(B)类型： 核酸
(C)链型： 单链
(D)拓扑结构： 线性

(ii)分子类型： 基因组 DNA

(vi)原始来源：
(A)生物体： 酿酒酵母
(B)菌株： YSA7

(ix)特征：
(A)名称/关键词： CDS
(B)位置： 1 to 1512
(C)鉴别方法： E

(xi)序列描述： SEQ ID NO： 1

```
ATG AGG AAG CTA AAT CCA GCT TTA GAA TTT AGA GAC TTT ATC CAG GTC      48
Met Arg Lys Leu Asn Pro Ala Leu Glu Phe Arg Asp Phe Ile Gln Val
 1               5                  10                  15
TTA AAA GAT GAA GAT GAC TTA ATC GAA ATT ACC GAA GAG ATT GAT CCA      96
Leu Lys Asp Glu Asp Asp Leu Ile Glu Ile Thr Glu Glu Ile Asp Pro
            20                  25                  30
AAT CTC GAA GTA GGT GCA ATT ATG AGG AAG GCC TAT GAA TCC CAC TTA     144
Asn Leu Glu Val Gly Ala Ile Met Arg Lys Ala Tyr Glu Ser His Leu
        35                  40                  45
CCA GCC CCG TTA TTT AAA AAT CTC AAA GGT GCT TCG AAG GAT CTT TTC     192
Pro Ala Pro Leu Phe Lys Asn Leu Lys Gly Ala Ser Lys Asp Leu Phe
    50                  55                  60
AGC ATT TTA GGT TGC CCA GCC GGT TTG AGA AGT AAG GAG AAA GGA GAT     240
Ser Ile Leu Gly Cys Pro Ala Gly Leu Arg Ser Lys Glu Lys Gly Asp
65                  70                  75                  80
CAT GGT AGA ATT GCC CAT CAT CTG GGG CTC GAC CCA AAA ACA ACT ATC     288
His Gly Arg Ile Ala His His Leu Gly Leu Asp Pro Lys Thr Thr Ile
                85                  90                  95
AAG GAA ATC ATA GAT TAT TTG CTG GAG TGT AAG GAG AAG GAA CCT CTC     336
Lys Glu Ile Ile Asp Tyr Leu Leu Glu Cys Lys Glu Lys Glu Pro Leu
            100                 105                 110
CCC CCA ATC ACT GTT CCT GTG TCA TCT GCA CCT TGT AAA ACA CAT ATA     384

Pro Pro Ile Thr Val Pro Val Ser Ser Ala Pro Cys Lys Thr His Ile
        115                 120                 125
CTT TCT GAA GAA AAA ATA CAT CTA CAA AGC CTG CCA ACA CCA TAT CTA     432
Leu Ser Glu Glu Lys Ile His Leu Gln Ser Leu Pro Thr Pro Tyr Leu
    130                 135                 140
CAT GTT TCA GAC GGT GGC AAG TAC TTA CAA ACG TAC GGA ATG TGG ATT     480
His Val Ser Asp Gly Gly Lys Tyr Leu Gln Thr Tyr Gly Met Trp Ile
145                 150                 155                 160
CTT CAA ACT CCA GAT AAA AAA TGG ACT AAT TGG TCA ATT GCT AGA GGT     528
Leu Gln Thr Pro Asp Lys Lys Trp Thr Asn Trp Ser Ile Ala Arg Gly
                165                 170                 175
ATG GTT GTA GAT GAC AAG CAT ATC ACT GGT CTG GTA ATT AAA CCA CAA     576
Met Val Val Asp Asp Lys His Ile Thr Gly Leu Val Ile Lys Pro Gln
            180                 185                 190
```

```
CAT ATT AGA CAA ATT GCT GAC TCT TGG GCA GCA ATT GGA AAA GCA AAT      624
His Ile Arg Gln Ile Ala Asp Ser Trp Ala Ala Ile Gly Lys Ala Asn
        195                 200                 205
GAA ATT CCT TTC GCG TTA TGT TTT GGC GTT CCC CCA GCA GCT ATT TTA      672
Glu Ile Pro Phe Ala Leu Cys Phe Gly Val Pro Pro Ala Ala Ile Leu
    210                 215                 220
GTT AGT TCC ATG CCA ATT CCT GAA GGT GTT TCT GAA TCG GAT TAT GTT      720
Val Ser Ser Met Pro Ile Pro Glu Gly Val Ser Glu Ser Asp Tyr Val
225                 230                 235                 240
GGC GCA ATC TTG GGT GAG TCG GTT CCA GTA GTA AAA TGT GAG ACC AAC      768
Gly Ala Ile Leu Gly Glu Ser Val Pro Val Val Lys Cys Glu Thr Asn
                245                 250                 255
GAT TTA ATG GTT CCT GCA ACG AGT GAG ATG GTA TTT GAG GGT ACT TTG      816
Asp Leu Met Val Pro Ala Thr Ser Glu Met Val Phe Glu Gly Thr Leu
            260                 265                 270
TCC TTA ACA GAT ACA CAT CTG GAA GGC CCA TTT GGT GAG ATG CAT GGA      864
Ser Leu Thr Asp Thr His Leu Glu Gly Pro Phe Gly Glu Met His Gly
        275                 280                 285
TAT GTT TTC AAA AGC CAA GGT CAT CCT TGT CCA TTG TAC ACT GTC AAG      912
Tyr Val Phe Lys Ser Gln Gly His Pro Cys Pro Leu Tyr Thr Val Lys
    290                 295                 300
GCT ATG AGT TAC AGA GAC AAT GCT ATT CTA CCT GTT TCG AAC CCC GGT      960

Ala Met Ser Tyr Arg Asp Asn Ala Ile Leu Pro Val Ser Asn Pro Gly
305                 310                 315                 320
CTT TGT ACG.GAT GAG ACA CAT ACC TTG ATT GGT TCA CTA GTG GCT ACT     1008
Leu Cys Thr Asp Glu Thr His Thr Leu Ile Gly Ser Leu Val Ala Thr
                325                 330                 335
GAG GCC AAG GAG CTG GCT ATT GAA TCT GGC TTG CCA ATT CTG GAT GCC     1056
Glu Ala Lys Glu Leu Ala Ile Glu Ser Gly Leu Pro Ile Leu Asp Ala
            340                 345                 350
TTT ATG CCT TAT GAG GCT CAG GCT CTT TGG CTT ATC TTA AAG GTG GAT     1104
Phe Met Pro Tyr Glu Ala Gln Ala Leu Trp Leu Ile Leu Lys Val Asp
        355                 360                 365
```

```
TTG AAA GGG CTG CAA GCA TTG AAG ACA ACG CCT GAA GAA TTT TGT AAG     1152
Leu Lys Gly Leu Gln Ala Leu Lys Thr Thr Pro Glu Glu Phe Cys Lys
    370                 375                 380
AAG GTA GGT GAT ATT TAC TTT AGG ACA AAA GTT GGT TTT ATA GTC CAT     1200
Lys Val Gly Asp Ile Tyr Phe Arg Thr Lys Val Gly Phe Ile Val His
385                 390                 395                 400
GAA ATA ATT TTG GTG GCA GAT GAT ATC GAC ATA TTT AAC TTC AAA GAA     1248
Glu Ile Ile Leu Val Ala Asp Asp Ile Asp Ile Phe Asn Phe Lys Glu
                405                 410                 415
GTC ATC TGG GCC TAC GTT ACA AGA CAT ACA CCT GTT GCA GAT CAG ATG     1296
Val Ile Trp Ala Tyr Val Thr Arg His Thr Pro Val Ala Asp Gln Met
            420                 425                 430
GCT TTT GAT GAT GTC ACT TCT TTT CCT TTG GCT CCC TTT GTT TCG CAG     1344
Ala Phe Asp Asp Val Thr Ser Phe Pro Leu Ala Pro Phe Val Ser Gln
        435                 440                 445
TCA TCC AGA AGT AAG ACT ATG AAA GGT GGA AAG TGC GTT ACT AAT TGC     1392
Ser Ser Arg Ser Lys Thr Met Lys Gly Gly Lys Cys Val Thr Asn Cys
    450                 455                 460
ATA TTT AGA CAG CAA TAT GAG CGC AGT TTT GAC TAC ATA ACT TGT AAT     1440
Ile Phe Arg Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe Asp Tyr Ile Thr Cys Asn
465                 470                 475                 480
TTT GAA AAG GGA TAT CCA AAA GGA TTA GTT GAC AAA GTA AAT GAA AAT     1488
Phe Glu Lys Gly Tyr Pro Lys Gly Leu Val Asp Lys Val Asn Glu Asn
                485                 490                 495
TGG AAA AGG TAC GGA TAT AAA TAA                                     1512

Trp Lys Arg Tyr Gly Tyr Lys
            500
```

（2）SEQ ID NO：2的信息：

(i)序列特征：

(A)长度：3930

(B)类型：核酸

(C)链型：单链

(D)拓扑结构：线性

(ii)分子类型：基因组DNA

(vi)原始来源：

(A)生物体：酿酒酵母

(B)菌株：YSA7

(ix)特征：

(A)名称/关键词：CDS

(B)位置：532 to 2043

(C)鉴别方法：E

(ix)特征：

(A)名称/关键词：酶切位点

(B)位置：1－6，3923－3930

(C)鉴别方法：S

(D)其他信息：BamHI酶切位点

(ix)特征：

(A)名称/关键词：酶切位点

(B)位置：656－661

(C)鉴别方法：S

(D)其他信息：StuI 酶切位点

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 酶切位点

(B)位置: 1527 - 1732

(C)鉴别方法: S

(D)其他信息: SpeI 酶切位点

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 酶切位点

(B)位置: 3555 - 3600

(C)鉴别方法: S

(D)其他信息: SalI 酶切位点

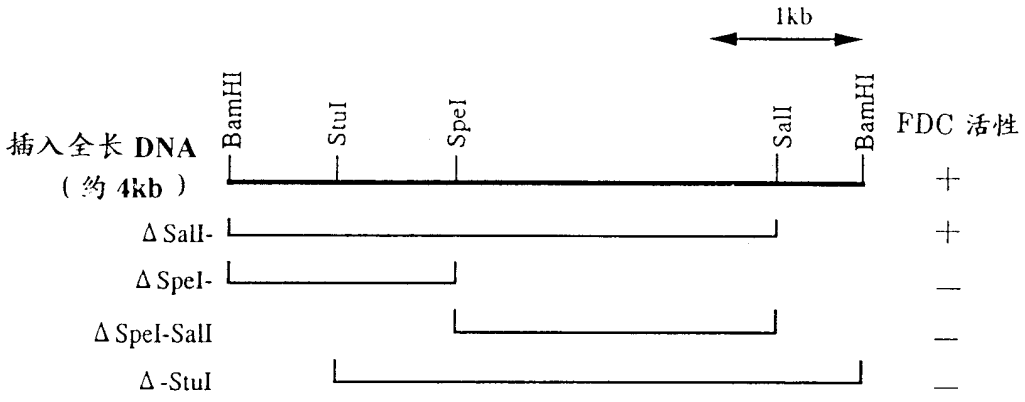
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2

GGATCCTAGA CTGCTTTGGC ATCCACGCTG ACACTTTTCC TCGTTGGGAA GGAATAAAAA 60
GCAAGTAACA CTTTTTCTGA GCATTTTATT ACGTTACTCA ACTACTAATA GAGTTGATTT 120
GTTACTTGCT AAAATCTTTT TATATTTCTT TTAGCCCCGA CAGAACTTGT TGCAAATGAA 180
TACAAACCGT GAACTTCCCG ATATCATTCT AATTGAACCC AGATATTTAC ACATGTACTT 240
CTTACTCATT TTCAATGTCA GCTTAAATAT CGTCTAAAAC AATATTTTAC TAGATACGCA 300
GTTCAATCTT CGCGCATATT TTCACGAAAG TCCAAATTGC GTACGTAGTT TTATGTCAAA 360
GTGACCGCCG TTGTAGCGTA CTTTTTCCTA TAAGACAAGC TCGTGATATC AGGAATATAT 420
CAGGAATGTA AACGAATACC GCATATCTTT TTGATTTTTT TCCTCTGAGT TATTCTATTC 480
TTGACATTAT TACATCACCA ATTCAAAAGA ATTGTCAATT TATATATTTA AATGAGGAAG 540
CTAAATCCAG CTTTAGAATT TAGAGACTTT ATCCAGGTCT TAAAAGATGA AGATGACTTA 600
ATCGAAATTA CCGAAGAGAT TGATCCAAAT CTCGAAGTAG GTGCAATTAT GAGGAAGGCC 660
TATGAATCCC ACTTACCAGC CCCGTTATTT AAAAATCTCA AAGGTGCTTC GAAGGATCTT 720
TTCAGCATTT TAGGTTGCCC AGCCGGTTTG AGAAGTAAGG AGAAAGGAGA TCATGGTAGA 780
ATTGCCCATC ATCTGGGGCT CGACCCAAAA ACAACTATCA AGGAAATCAT AGATTATTTG 840
CTGGAGTGTA AGGAGAAGGA ACCTCTCCCC CCAATCACTG TTCCTGTGTC ATCTGCACCT 900
TGTAAAACAC ATATACTTTC TGAAGAAAAA ATACATCTAC AAAGCCTGCC AACACCATAT 960
CTACATGTTT CAGACGGTGG CAAGTACTTA CAAACGTACG GAATGTGGAT TCTTCAAACT 1020
CCAGATAAAA AATGGACTAA TTGGTCAATT GCTAGAGGTA TGGTTGTAGA TGACAAGCAT 1080
ATCACTGGTC TGGTAATTAA ACCACAACAT ATTAGACAAA TTGCTGACTC TTGGGCAGCA 1140

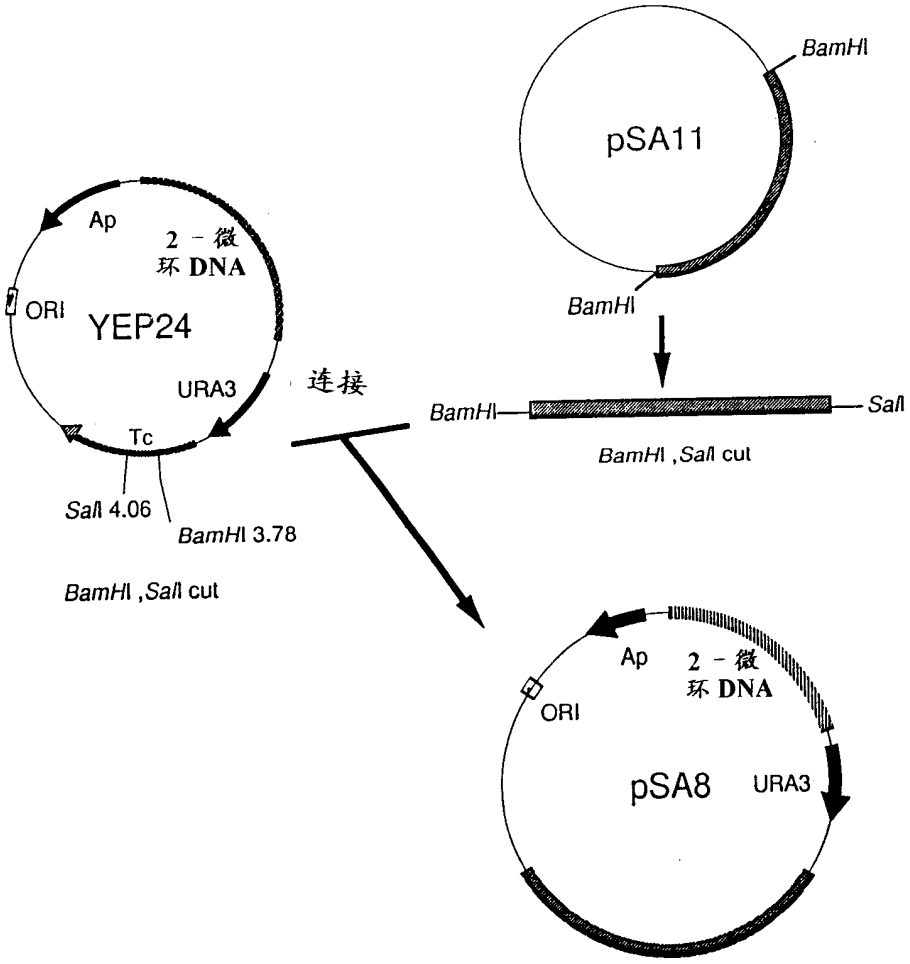
ATTGGAAAAG CAAATGAAAT TCCTTTCGCG TTATGTTTTG GCGTTCCCCC AGCAGCTATT 1200
TTAGTTAGTT CCATGCCAAT TCCTGAAGGT GTTTCTGAAT CGGATTATGT TGGCGCAATC 1260
TTGGGTGAGT CGGTTCCAGT AGTAAAATGT GAGACCAACG ATTTAATGGT TCCTGCAACG 1320
AGTGAGATGG TATTTGAGGG TACTTTGTCC TTAACAGATA CACATCTGGA AGGCCCATTT 1380
GGTGAGATGC ATGGATATGT TTTCAAAAGC CAAGGTCATC CTTGTCCATT GTACACTGTC 1440
AAGGCTATGA GTTACAGAGA CAATGCTATT CTACCTGTTT CGAACCCCGG TCTTTGTACG 1500
GATGAGACAC ATACCTTGAT TGGTTCACTA GTGGCTACTG AGGCCAAGGA GCTGGCTATT 1560
GAATCTGGCT TGCCAATTCT GGATGCCTTT ATGCCTTATG AGGCTCAGGC TCTTTGGCTT 1620
ATCTTAAAGG TGGATTTGAA AGGGCTGCAA GCATTGAAGA CAACGCCTGA AGAATTTTGT 1680
AAGAAGGTAG GTGATATTTA CTTTAGGACA AAAGTTGGTT TTATAGTCCA TGAAATAATT 1740
TTGGTGGCAG ATGATATCGA CATATTTAAC TTCAAAGAAG TCATCTGGGC CTACGTTACA 1800
AGACATACAC CTGTTGCAGA TCAGATGGCT TTTGATGATG TCACTTCTTT TCCTTTGGCT 1860
CCCTTTGTTT CGCAGTCATC CAGAAGTAAG ACTATGAAAG GTGGAAAGTG CGTTACTAAT 1920
TGCATATTTA GACAGCAATA TGAGCGCAGT TTTGACTACA TAACTTGTAA TTTTGAAAAG 1980
GGATATCCAA AAGGATTAGT TGACAAAGTA AATGAAAATT GGAAAAGGTA CGGATATAAA 2040
TAATTGCCAT AGACTTTCTA CGGAAGAAAA ACCATATAAT CAGATTTTAA ATAAAATTTT 2100
CCGAACTTTT ATACTCCACG GTTTTGGAGT TGTTTGATTG CAGTGACAAG CAGTGCGCCA 2160
TTAACACTAT CCATCTTTCG TACAAAGTAA AGATAAAGTT ATTTTCCTGA GGTGAGAACC 2220
GTAAATCTTT ATAGACAAGG AGTATTTATA ACTAAACTAT TACCTTGTTA CTTATGGAAT 2280
TAATCTTGAC TAATAGGCAG ATGATCAACA GTTATTGATT TTGAGTGAAA GTCCATAAAG 2340
TTACAGTATG TAATTACAGT ACGTAATTAA GGAATGTCTG TAAATATATG CTCCTTTTTT 2400
TTTTTCCACT TACTATGATT TTAGTAAAGC ACCATGATGA TGTAGATGCG TAATACTCTA 2460
TAAATGTAAC ATCGTTAAAG CATTGGTTAT TTTAATTTCA TTCTATAAAC CAATATTTCT 2520
GACAGCACAT AAAAAATAAA TGGACTATAT TAACAGCAAA TATCGGTTAA TCTAGGGCAT 2580
AATTATTTAA CATCAAAAAG AAAGTTGCTA GTTGTTCTAG TATTGCTCGG AGTACCTCAA 2640
ACGGTAAAAA GATAATATTT GTTTCCGCTT TTATCATTGA ATAGCTTAGA AATTCTCTCC 2700
CTAGCGACCA TTTAAGGAAT GTAGCTAACA AAAATGATTC AAGTATGTTG CTCCTAAGCA 2760
GATATGTACT CTATAAGTTG AATCACTATA TCATTGAAAT ATAGTGGCGA GGGCGTACAT 2820
AAAATCAAAG GAACTATGCA ATAGACTCAA TTAAATGCCA CATAGCTATT TAAGACTCCA 2880
AATCTCCAAT ACAATCATTC GTTAAAGATT TTTTGTATTC TGCTGATATC TTTTTCTACA 2940
GTTTCTTGAG TGTCTAGTGA TTGCATAAAA TGACCACAGT ATTTTTAGTA CTCATGGCCT 3000
GTATGCAATT GCAAGGAACG GTATTACTTT TACAAAAACC CTGCTTTCCG GCAAGTTCAG 3060
CTGTCATTTG GTAAGATTTT GAAAATAGTG GAAACAATGG ATTATCAACG AATAGTCTTT 3120
AAACATAAGT GCTAAAATTC AAAACATCAT TTGATGCGTG CGGTGCATTT TTTCGTGCTG 3180
AATGAACTTT TGGAGATATC TGCCTTCGCC AATGAATATG CATTACCATT AATTGCATAG 3240
TAACCGTATA CATGAAAATG GAAATAATGA ACTGATTATT AAAAATAGCT AATGCAGGTG 3300

GGATTTGAGA CATTGTGGTT ATCCTGTCAG CCTGTATTTT GCGCTTTAAG GTATTTCATA 3360
AAAGTTAGAA TAAAATTTAA AAGTTCCATT CTATGAAACT GTAATTATAG GTATATACTA 3420
TCATCTACCA ATCTTACCCA TGTATAGTTC TAATATTAAA GACAGAGTAG GTAAAAAAAA 3480
AAATGGTAAT CAAAACGTGA TCGCTTATAT TCGGTATGGA CAAGCTTTGA ATATTCCCTA 3540
GAAAATGCAA TAGTATGTCA TAATGAAAGA AGATTGTAAT ACAATGCTTG GAATGTCGAC 3600
CGGCAGAAAC CCGTGTCACA TGGCCTTATT CAACGTGACG TTGTGATATA TGTAGAACAT 3660
GCTTTAGATG AGGCGGTATT TGACTGTAGC ATCTTCTAAA ATGTGCTGAT ATTGTTAAAT 3720
CTCAATCAAA CTGAGAGAGT ATGAGAGACT GAAAAAGTGG GATTCTGCCT GTGGTGCTAA 3780
TATCCTTAAA ATGCTAAACT GAAAGAAGTA ATATAATCAT ATATATTGAT CATGTATCAT 3840
ACAAAAGATG CATGTATTTT AGTAATATTA ACTGCTACTA TGATGTAGTA GACGATCGAT 3900
AATCGAATCT TGCGGTATAT TCTAGGATCC 3930

# 图 1


1kb
BamHI
StuI
SpeI
SalI
BamHI
FDC 活性
插入全长 DNA
（约 4kb）
Δ SalI-
Δ SpeI-
Δ SpeI-SalI
Δ -StuI
+
+
—
—
—

# 图 2


BamHI
pSA11
BamHI
Ap
2 - 微
环 DNA
ORI
YEP24
URA3
Tc
连接
BamHI
SalI
BamHI ,SalI cut
SalI 4.06
BamHI 3.78
BamHI ,SalI cut
Ap
2 - 微
环 DNA
ORI
pSA8
URA3