



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0115500
(43) 공개일자 2012년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/16 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/28 (2006.01) *C07C 29/86* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7016239
(22) 출원일자(국제) 2010년11월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/057791
(87) 국제공개번호 WO 2011/063391
국제공개일자 2011년05월26일
(30) 우선권주장
61/263,519 2009년11월23일 미국(US)

(71) 출원인
부타ックス 어드밴스드 바이오피얼스 엘엘씨
미국 19880 브라운스빌 월밍تون 파우더 밀 로드
200 익스페리멘탈 스테이션 비268/알226
(72) 발명자
그레이, 마이클, 찰스
미국 08107 뉴저지주 오클린 헤더 로드 147
파트나이크, 란잔
미국 19702 브라운스빌 월밍تون 파우더 밀 로드
드라이브 5
(74) 대리인
김영, 양영준, 양영환

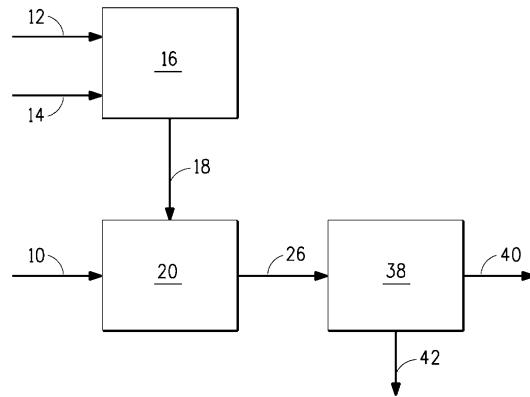
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 전해질 첨가를 동반한 추출성 발효를 사용해 부탄올을 제조하는 방법

(57) 요 약

부탄올 제조물은, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도의 적어도 하나의 전해질의 존재 하에서 불수용성 유기 추출용매로 추출함으로써 발효 동안에 제거되는, 미생물 발효를 통해 부탄올을 제조하는 방법이 제공된다. 전해질은 발효 배지 내에서, 또는 2상 발효 배지의 수성상 내에서 해리되어 유리 이온을 형성하는 염을 포함할 수 있다. 또한, 발효 배지로부터 부탄올을 회수하는 방법 및 조성물이 제공된다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

- a) 부탄올, 물, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가 시키기에 적어도 충분한 농도의 적어도 하나의 전해질, 및 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 포함하는 발효 배지를 제공하는 단계;
- b) 발효 배지를 i) C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수 용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C_7 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_7 내지 C_{22} 지방산, C_7 내지 C_{22} 지방산의 에스 테르, C_7 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택 되는 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜, 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 단계; 및
- c) 부탄올을 부탄올-함유 유기상으로부터 회수하여, 회수된 부탄올을 제조하는 단계를 포함하는, 발효 배지로부터 부탄올을 회수하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

- a) 기체를 사용하여 발효 배지로부터 부탄올을 스트라이핑(stripping)하여 부탄올-함유 기체상을 형성하는 단계; 및
- b) 부탄올-함유 기체상으로부터 부탄올을 회수하는 단계를 포함하는 과정에 의해, 일부의 부탄올이 발효 배지로부터 동시에 제거되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 전해질은 리튬, 나트륨, 칼륨, 루비듐, 세슘, 마그네슘, 칼슘, 스트론튬, 바륨, 암모늄, 포스 포늄, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 양이온을 갖는 염을 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 전해질은 설페이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 포스페이트, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 음이온을 갖는 염을 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 전해질은 황산나트륨, 염화나트륨, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 유전자 변형 미생물은 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균(filamentous fungi) 및 효모로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 박테리아는 자이모모나스(Zymomonas), 에스케리키아(Escherichia), 살모넬라(Salmonella), 로도코커스(Rhodococcus), 슈도모나스(Pseudomonas), 바실러스(Bacillus), 락토바실러스(Lactobacillus), 엔테로

코커스(Enterococcus), 페디오코커스(Pediococcus), 알칼리제네스(Alcaligenes), 클레브시엘라(Klebsiella), 파에니바실러스(Paenibacillus), 아트로박터(Arthrobacter), 코리네박테리움(Corynebacterium) 및 브레비박테리움(Brevibacterium)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 효모는 피키아(Pichia), 칸디다(Candida), 한세눌라(Hansenula), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 이싸트켄키아(Issatchenka) 및 사카로마이세스(Saccharomyces)로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 제1 추출용매는 올레일 알코올, 베헤닐 알코올, 세틸 알코올, 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 스테아릴 알코올, 올레산, 라우르산, 미리스트산, 스테아르산, 메틸 미리스테이트, 메틸 올레이트, 라우릭 알데하이드, 1-도데칸올 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 제1 추출용매는 올레일 알코올을 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 제2 추출용매는 1-노난올, 1-데칸올, 1-운데칸올, 2-운데칸올, 1-노나닐, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 부탄올은 1-부탄올인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 부탄올은 2-부탄올인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 부탄올은 아이소부탄올인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 발효 배지는 에탄올을 추가로 포함하며, 부탄올-함유 유기상은 에탄올을 함유하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 유전자 변형 미생물은 탄소 유동의 경쟁적인 경로를 불활성화시키는 변형을 포함하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 유전자 변형 미생물은 아세톤을 제조하지 않는 방법.

청구항 19

- a) 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 제공하는 단계;
- b) 수성상, 및 i) C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C_7 내지 C_{22} 알코올, C_7 내지 C_{22} 카르복실산, C_7 내지 C_{22} 카르복실산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매를 포함하는 2상(biphasic) 발효 배지 내에서, 유기 추출용매 내로 부탄올이 추출되게 하기에 충분한 시간 동안 미생물을 성장시켜 부탄올-함유 유기상을 형성하며, 여기서, 2상 발효 배지는 추가로, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도

충분한 농도로 적어도 하나의 전해질을 포함하는 단계;

c) 부탄올-함유 유기상을 수성상으로부터 분리하는 단계; 및

d) 임의로, 부탄올을 부탄올-함유 유기상으로부터 회수하여 회수된 부탄올을 제조하는 단계를 포함하는, 부탄올을 제조하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 전해질은 미생물의 성장기 동안에 수성상에, 부탄올 제조기(production phase) 동안에 수성상에, 수성상 내 부탄올 농도가 억제성일 때 수성상에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가되는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 전해질은 발효 배지로부터 수득되는 방법.

청구항 22

a) 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 제공하는 단계;

b) 미생물을 발효 배지에서 성장시키며, 여기서, 미생물은 부탄올을 발효 배지 내로 제조하여 부탄올-함유 발효 배지를 제조하는 단계;

c) 적어도 하나의 전해질을 발효 배지에 첨가하여, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도의 전해질을 제공하는 단계;

d) 부탄올-함유 발효 배지 중 적어도 일부를 i) C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C_7 내지 C_{22} 알코올, C_7 내지 C_{22} 카르복실산, C_7 내지 C_{22} 카르복실산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜, 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 단계;

e) 임의로, 부탄올을 부탄올-함유 유기상으로부터 회수하는 단계; 및

f) 임의로, 수성상 중 적어도 일부를 발효 배지로 되돌리는 단계를 포함하는, 부탄올을 제조하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 전해질은 미생물 성장기가 느려질 때 단계 (c)에서 발효 배지에 첨가되는 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 전해질은 부탄올 제조기가 완료될 때 단계 (c)에서 발효 배지에 첨가되는 방법.

청구항 25

제1항, 제19항 또는 제22항에 있어서, 상기 적어도 하나의 발효가능한 탄소원은 발효 배지 내에 존재하고, 농업 원료, 조류, 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그노셀룰로스(lignocellulose), 또는 그의 임의의 조합 유래의 재생가능한 탄소를 포함하는 방법.

청구항 26

(a) 부탄올, 물, 부탄올 분배 계수 이온 배지를 증가시키기에 적어도 충분한 농도의 적어도 하나의 전해질, 및 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 포함하는 발효 배지;

b) C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매; 및

c) 임의로, C_7 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_7 내지 C_{22} 지방산, C_7 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매를 포함하는 조성물로서,

여기서, 상기 조성물은 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하여, 부탄올이 (a)의 발효 배지로부터 분리될 수 있는, 조성물.

명세서

기술 분야

[0001]

관련 출원과의 상호 참조

[0002]

본 출원은 그 전체가 참조로서 본원에 삽입된 2009년 11월 23일에 출원된 미국 특허 가출원 일련번호 제 61/263,519호를 우선권으로 그 이점을 주장한다.

[0003]

본 발명은 생물연료 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, 본 발명은 미생물 발효를 통해 부탄올을 제조하는 방법에 관한 것이고, 여기서, 적어도 하나의 전해질은 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수와 비교해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 발효 배지 내에서 존재하고, 부탄올 제조물은 불수용성 유기 추출용매로 추출됨으로써 제거된다.

배경기술

[0004]

부탄올은 연료 첨가제로서, 디젤 연료에의 블렌드 성분으로서, 플라스틱 산업에서 원료 화학물질로서, 그리고 식음료 산업에서 식용등급 추출용매로서의 용도와 같은 다양한 응용을 갖는 중요한 산업 화학물질이다. 매년 45억 4천 킬로그램 내지 54억 4천 킬로그램(100억 내지 120억 파운드)의 부탄올은 석유화학 수단에 의해 제조된다. 부탄올에 대한 필요성이 증가함에 따라, 발효에 의해 옥수수, 사탕수수 또는 셀룰로오스성 공급원과 같은 재생가능한 자원으로부터 이러한 화학물질을 제조하는데 대한 흥미가 증폭되고 있다.

[0005]

부탄올을 제조하는 발효 공정에서, 본래 장소에서의 (*in situ*) 제조물 제거는 유리하게는 미생물의 부탄올 억제를 감소시키고, 발효 브로쓰 내에서 부탄올 농도를 조절함으로써 발효 속도를 개선시킨다. 본래 자리에서의 제조물 제거 기술에는 스트라이핑(stripping), 흡착, 투과증발(pervaporation), 막 용매 추출, 및 액체-액체 추출이 포함된다. 액체-액체 추출에서, 추출용매는 발효 브로쓰와 접촉되어, 발효 브로쓰 및 추출용매 상(phase) 사이에 부탄올을 분배한다. 부탄올 및 추출용매는 분리 과정에 의해, 예를 들어 증류에 의해 회수된다.

[0006]

문헌 [J.J. Malinowski and A.J. Daugulis, AIChE Journal (1994), 40(9), 1459-1465]는, 사이클로펜탄올, *n*-발레르알데하이드, *tert*-아밀 알코올, 및 아돌 85NF(Adol 85NF)(대개 올레일 알코올로 이루어짐)를 추출용매로서 사용해, 희석된 수용액으로부터 1-부탄올, 에탄올, 및 아세톤을 추출하는 것에 대한 염 첨가의 효과를 평가하기 위한 실험 연구를 개시한다. 저자들은 그들의 결론에서, 염 첨가가 발효 과정에서 전형적으로 발견되는 희석된 수용액으로부터 에탄올, 1-부탄올, 및 아세톤의 추출을 제공하는 이점에도 불구하고, 그러한 과정 형상의 실제적인 실행은 현재 제한되어 있음을 언급한다. 본래 자리에서의 회수 전략(추출성 발효)으로서, 필요할 수 있는 상대적으로 높은 염 농도는 삼투압 쇼크로 인해 발생하는 세포에 대한 심각하게 유해한 효과를 가질 수 있었다.

[0007]

공개된 특허 출원 제US 2009/0171129 A1호는, 발효 브로쓰와 같은 희석된 수용액으로부터 C3-C6 알코올을 회수하는 방법을 개시한다. 이 방법은 수용액의 일부분 내에서의 C3-C6 알코올의 활성을, 적어도 그 일부분 내에서의 C3-C6 알코올의 포화 활성을 증가시키는 것을 포함한다. 본 발명의 실시 양태에 따르면, C3-C6 알코올의 활성을 증가시키는 것은 수용액에 친수성 용질을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 충분한 친수성 용질이 첨가되어, 오로지 친수성 용질의 첨가에 의해서만 또는 다른 과정 단계와 조합되어, 제2 액체상을 형성할 수 있다. 첨가되는 친수성 용질은 염, 아미노산, 수용성 용매, 당 또는 이들의 조합물일 수 있다.

[0008]

2009년 6월 4일에 출원된 미국 특허 출원 제12/478,389호는, 발효 브로쓰로부터 부탄올을 제조하고 회수하는 방법을 개시하며, 이 방법은 발효 브로쓰를 C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜, 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 단계를 포함한다.

[0009]

2009년 4월 13일에 동시 출원된 미국 특허 가출원 제61/168,640호; 제61/168,642호; 및 제61/168,645호; 및

2009년 8월 6일에 동시 출원된 제61/231,697호; 제61/231,698호; 및 제61/231,699호는, 발효 배지로부터 부탄올을 제조하고 회수하는 방법을 개시하며, 이 방법은 발효 배지를 제1 용매 및 제2 용매를 포함하는 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 단계를 포함하며, 제1용매는 C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알코올, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산의 에스테르, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알데하이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고, 제2 용매는 C₇ 내지 C₁₁ 알코올, C₇ 내지 C₁₁ 카르복실산, C₇ 내지 C₁₁ 카르복실산의 에스테르, C₇ 내지 C₁₁ 알데하이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0010] 발효 배지로부터 부탄올을 제조하고 회수하는 개선된 방법은 계속해서 탐구된다. 발효 배지에 전해질을 첨가하는 것이 개선된 부탄올 추출 효율 및 미생물과의 허용가능한 생물융화성을 제공하는, 부탄올의 본래 자리에서의 제조를 제거 과정이 필요하다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 부탄올, 물, 적어도 하나의 전해질, 및 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 회수하는 방법을 제공한다. 전해질은 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 발효 배지 내에 존재한다. 본 발명은 또한, 그러한 미생물 및 첨가되는 전해질을 사용하여 부탄올을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 발효 배지를 i) 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시키는 단계, 유기상으로부터 부탄올-함유 유기상을 분리하는 단계, 및 부탄올-함유 유기 상으로부터 부탄올을 회수하는 단계를 포함한다. 본 발명의 한 실시 양태에서:

[0012] a) 부탄올, 물, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도의 적어도 하나의 전해질, 및 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 포함하는 발효 배지를 제공하는 단계;

[0013] b) 발효 배지를 i) C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알코올, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산의 에스테르, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알데하이드, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C₇ 내지 C₂₂ 지방산 알코올, C₇ 내지 C₂₂ 지방산, C₇ 내지 C₂₂ 지방산의 에스테르, C₇ 내지 C₂₂ 지방산 알데하이드, C₇ 내지 C₂₂ 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시키, 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 단계;

[0014] c) 임의로, 부탄올-함유 유기상을 수성상으로부터 분리하는 단계; 및

[0015] d) 부탄올을 부탄올-함유 유기상으로부터 회수하여 회수된 부탄올을 제조하는 단계를 포함하는, 발효 배지로부터 부탄올을 회수하는 방법이 제공된다.

[0016] 일부 실시 양태에서, 부탄올의 일부는, a) 기체를 사용해 발효 배지로부터 부탄올을 스트라이핑하여 부탄올-함유 기체상을 형성하는 단계; 및 b) 부탄올-함유 기체상으로부터 부탄올을 회수하는 단계를 포함하는 과정에 의해 발효 배지로부터 동시에 제거된다.

[0017] 본 발명의 방법에 따르면, 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합물에 첨가될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 전해질은 리튬, 나트륨, 칼륨, 류비듐, 세슘, 마그네슘, 칼슘, 스트론튬, 바륨, 암모늄, 포스포늄, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 양이온을 갖는 염을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 전해질은 세레이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 포스페이트, 폴루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 음이온을 갖는 염을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 전해질은 황산나트륨, 염화나트륨, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0018] 본 발명의 방법에 따르면, 일부 실시 양태에서, 유전자 변형 미생물은 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 (filamentous fungi), 및 효모로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 양태에서, 박테리아는 자이모모나스 (Zymomonas), 에스케리키아 (Escherichia), 살로넬라 (Salmonella), 로도코커스 (Rhodococcus), 슈도모나스 (Pseudomonas), 바실러스 (Bacillus), 락토바실러스 (Lactobacillus), 엔테로코커스 (Enterococcus), 페디오코커

스(Pediococcus), 알칼리제네스(Alcaligenes), 클레브시엘라(Klebsiella), 파에니바실러스(Paenibacillus), 아트로박터(Arthrobacter), 코리네박테리움(Corynebacterium), 및 브레비박테리움(Brevibacterium)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 양태에서, 효모는 퍼키아(Pichia), 칸디다(Candida), 한세눌라(Hansenula), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 이싸트켄키아(Issatchenkia), 및 사카로마이세스(Saccharomyces)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 본 발명의 방법에 따르면, 제1 추출용매는 올레일 알코올, 베헤닐 알코올, 세틸 알코올, 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 스테아릴 알코올, 올레산, 라우르산, 미리스트산, 스테아르산, 메틸 미리스테이트, 메틸 올레에이트, 라우릭 알데하이드, 1-도데칸올, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 제1 추출용매는 올레일 알코올을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 제2 추출용매는 1-노난올, 1-데칸올, 1-운데칸올, 2-운데칸올, 1-노나날, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0020] 일부 실시 양태에서, 부탄올은 1-부탄올이다. 일부 실시 양태에서, 부탄올은 2-부탄올이다. 일부 실시 양태에서, 부탄올은 아이소부탄올이다. 일부 실시 양태에서, 발효 배지는 추가로 에탄올을 포함하고, 부탄올-함유 유기상은 에탄올을 함유한다.

[0021] 본 발명의 한 실시 양태에서:

[0022] a) 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 제공하는 단계;

[0023] b) 수성상, 및 i) C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C_7 내지 C_{22} 알코올, C_7 내지 C_{22} 카르복실산, C_7 내지 C_{22} 카르복실산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매를 포함하는 2상 발효 배지 내에서, 유기 추출용매 내로 부탄올이 추출되게 하기에 충분한 시간 동안 미생물을 성장시켜 부탄올-함유 유기상을 형성하며, 여기서, 2상 발효 배지는 추가로, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 적어도 하나의 전해질을 포함하는 단계;

[0024] c) 임의로, 부탄올-함유 유기상을 수성상으로부터 분리하는 단계; 및

[0025] d) 부탄올을 부탄올-함유 유기상으로부터 회수하여 회수된 부탄올을 제조하는 단계를 포함하는, 부탄올을 제조하는 방법이 제공된다.

[0026] 본 발명의 한 실시 양태에서:

[0027] a) 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 부탄올을 제조하는 유전자 변형 미생물을 제공하는 단계;

[0028] b) 미생물을 발효 배지에서 성장시키며, 여기에서 미생물은 부탄올을 발효 배지 내로 제조하여 부탄올-함유 발효 배지를 제조하는 단계;

[0029] c) 적어도 하나의 전해질을 발효 배지에 첨가하여, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 전해질을 제공하는 단계;

[0030] d) 부탄올-함유 발효 배지 중 적어도 일부를 i) C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C_7 내지 C_{22} 알코올, C_7 내지 C_{22} 카르복실산, C_7 내지 C_{22} 카르복실산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2상 혼합물을 형성하는 단계;

[0031] e) 임의로, 부탄올-함유 유기상을 수성상으로부터 분리하는 단계; 및

[0032] f) 부탄올을 부탄올-함유 유기상으로부터 회수하는 단계; 및

[0033] g) 임의로, 수성상의 적어도 일부를 발효 배지로 되돌리는 단계를 포함하는, 부탄올을 제조하는 방법이 제공된다.

- [0034] 일부 실시 양태에서, 유전자 변형 미생물은 탄소 유동을 위한 경쟁적인 경로를 불활성화시키는 변형을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 유전자 변형 미생물은 아세톤을 제조하지 않는다.
- [0035] 도면의 간단한 설명 및 서열 설명
- [0036] <도 1>
- [0037] 도 1은 발효 용기에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시키기 이전에, 용기 내에서 제1 추출용매와 제2 추출용매를 조합하는, 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0038] <도 2>
- [0039] 도 2는 발효 배지가 추출용매와 접촉되는 발효 용기에, 제1 추출용매와 제2 추출용매가 따로 첨가되는, 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0040] <도 3>
- [0041] 도 3은 제1 추출용매와 제2 추출용매가 상이한 발효 용기에 따로 첨가되는, 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0042] <도 4>
- [0043] 도 4는 제조물의 추출이 발효기의 다운스트림에서 발생하며, 상이한 용기 내에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시키기 이전에, 용기에서 제1 추출용매와 제2 추출용매를 조합하는, 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0044] <도 5>
- [0045] 도 5는 제조물의 추출이 발효기의 다운스트림에서 발생하며, 발효 배지가 추출용매와 접촉되는 용기에, 제1 추출용매와 제2 추출용매가 따로 첨가되는, 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0046] <도 6>
- [0047] 도 6은 제조물의 추출이 발효기의 다운스트림에서 발생하며, 발효 배지가 추출용매와 접촉되는 상이한 용기에, 제1 추출용매와 제2 추출용매가 따로 첨가되는 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0048] <도 7>
- [0049] 도 7은 발효 매쉬(mash)의 바닥 또는 그 근처에서 불수용성 유기 추출용매가 코-커런트 유동하는 것을 통해 제조물의 추출이 적어도 하나의 배치 발효기(batch fermentor)에서 발생하여, 발효기가 추출용매로 채워지며, 이 추출용매는 발효기의 상부 또는 그 근처의 지점에서 발효기로부터 유출되는, 본 발명의 방법의 한 실시 양태를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0050] 하기의 서열들은 37 C.F.R. 1.8211.825("뉴클레오티드 서열 및/또는 아미노산 서열 개시를 포함하는 특허출원에 관한 요건 - 서열 규정")를 따르며 세계지적재산권기구(World Intellectual Property Organization, WIPO) 표준 ST.25(1998), 및 EPO 및 PCT의 서열 목록 요건(규정 5.2 및 49.5(abis), 및 시행세칙의 섹션 208 및 부칙 C)에 부합한다.

[0051]

[표 1a]

코딩 서열 및 단백질의 서열 목록 번호

설명	서열 목록 번호: 핵산	서열 목록 번호: 아미노산
클레브시엘라 뉴모니아 bulB (<i>Klebsiella pneumoniae</i> bulB) (아세토락테이트 합성효소)	1	2
이. 콜라이) ilvC (아세토하이드록시산 환원이성질화효소(acetohydroxy acid reductoisomerase))	3	4
이. 콜라이) ilvD (아세토하이드록시산 탈수효소)	5	6
락토코코스 락티스 kivD (<i>Lactococcus lactis kivD</i>) (분지쇄 α -케토산 탈카르복실화효소)	7 (코돈 최적화된 것)	8
아크로모박터 자일로속시단스 sadB (<i>Achromobacter xylosoxidans sadB</i>) (부탄올 탈수소효소)(9	10
바실러스 서브틸리스 alsS (<i>Bacillus subtilis alsS</i>) (아세토락테이트 합성효소)	11	12
S. 세레비시애 ILV5 (<i>S. cerevisiae ILV5</i>) (아세토하이드록시산 환원이성질화효소; "KARI")	13	14
풀연변이체 KARI (Pf5.ilvC-Z4B8 에 의해 인코딩된 것)	15	16
스트렙토코코스 무탄스 ilvD (<i>Streptococcus mutans ilvD</i>) (아세토하이드록시산)	17	18

[0052]

탈수효소)		
바실러스 서보틸리스 kivD (분지 쇄 케토산 탈카르복실화효소)	19 (코돈 최적화된 것)	20
말 간 알코올 탈수효소(Horse liver alcohol dehydrogenase) (HADH)	56 (코돈 최적화된 것)	57
이. 콜라이 pfIB (페루메이트 포르메이트 리아제)	71	70
이. 콜라이 frdB (푸마레이트 환원효소 효소 복합체의 하위단위(subunit of fumarate reductase enzyme complex))	73	72
이. 콜라이 idhA (락테이트 탈수효소)	77	76
이. 콜라이 adhE (알코올 탈수효소)	75	74
이. 콜라이 frdA (푸마레이트 환원효소 효소 복합체의 하위단위)	91	90
이. 콜라이 frdC (푸마레이트 환원효소 효소 복합체의 하위단위)	93	92
이. 콜라이 frdD (푸마레이트 환원효소 효소 복합체의 하위단위)	95	94

[0053]

[0054]

[표 1b]

구성에 사용되는 서열, 프라이머 및 벡터의 서열 목록 번호	
설명	서열 번호
p R S 4 2 5 :: G P M - s a d B	6 3
G P M - s a d B - A D H t 절편	2 1
p U C 1 9 - U R A 3 r	2 2
1 1 4 1 1 7 - 1 1 A	2 3
1 1 4 1 1 7 - 1 1 B	2 4
1 1 4 1 1 7 - 1 1 C	2 5
1 1 4 1 1 7 - 1 1 D	2 6
1 1 4 1 1 7 - 1 3 A	2 7
1 1 4 1 1 7 - 1 3 B	2 8
1 1 2 5 9 0 - 3 4 F	2 9
1 1 2 5 9 0 - 3 4 G	3 0
1 1 2 5 9 0 - 3 4 H	3 1
1 1 2 5 9 0 - 4 9 E	3 2
i l v D - F B A 1 t 절편	3 3
1 1 4 1 1 7 - 2 7 A	3 4
1 1 4 1 1 7 - 2 7 B	3 5
1 1 4 1 1 7 - 2 7 C	3 6
1 1 4 1 1 7 - 2 7 D	3 7
1 1 4 1 1 7 - 3 6 D	3 8
1 3 5	3 9
1 1 2 5 9 0 - 3 0 F	4 0
U R A 3 r 2 주형	4 1
1 1 4 1 1 7 - 4 5 A	4 2
1 1 4 1 1 7 - 4 5 B	4 3
P D C 5 :: K a n M X F	4 4
P D C 5 :: K a n M X R	4 5
P D C 5 k o f o r	4 6
N 1 7 5	4 7
p L H 4 7 5 - Z 4 B 8 플라스미드	4 8
C U P I 프로모터	4 9
C Y C 1 종결자 C Y C 1 - 2	5 0
I L V 5 프로모터	5 1
I L V 5 종결자	5 2

[0055]

F B A 1 프로모터	5 3
C Y C 1 종결자	5 4
p L H 4 6 8 플라스미드	5 5
백터 p N Y 8	5 8
G P D 1 프로모터	5 9
G P D 1 프로모터 단편	6 0
O T 1 0 6 8	6 1
O T 1 0 6 7	6 2
G P M 1 프로모터	6 4
A D H 1 종결자	6 5
O T 1 0 7 4	6 6
O T 1 0 7 5	6 7
p R S 4 2 3 F B A i l v D (S t r e p)	6 8
F B A 종결자	6 9
p f l B C k U p	7 8
p f l B C k D n	7 9
f r d B C k U p	8 0
f r d B C k D n	8 1
l d h A C k U p	8 2
l d h A C k D n	8 3
a d h E C k U p	8 4
a d h E C k D n	8 5
N 4 7 3	8 6
N 4 6 9	8 7
N 6 9 5 A	8 8
N 6 9 5 B	8 9

[0056]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057]

본 발명은 불수용성 유기 추출용매 내로 추출하여 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성함으로써 적어도 하나의 전해질을 포함하는 미생물 발효 배지로부터 부탄올을 회수하는 방법을 제공한다. 전해질은 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 발효 배지 내에 존재한다. 부탄올-함유 유기상은 수성상으로부터 분리되고, 부탄올은 회수될 수 있다. 부탄올 제조 방법이 또한 제공된다.

[0058]

정의

[0059]

하기 정의가 본 개시문현에서 사용된다.

[0060]

용어 "전해질"은 수용액 내에서 이온화되거나 해리되고 이온성 전도체로서 기능할 수 있는 용질을 말한다.

[0061]

용어 "부탄올"은 개별적으로 또는 그의 혼합물로서, 1-부탄올, 2-부탄올, 및/또는 아이소부탄올을 말한다.

[0062]

용어 "불수용성"은 발효 브로쓰(fermentation broth)와 같은 수용액과 하나의 액체상을 형성하는 것과 같은 방식으로 혼합될 수 없는, 추출용매 또는 용매와 같은 화학적 성분을 말한다.

[0063]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "추출용매"는 발효 브로쓰로부터 부탄올을 추출하는데 사용되는 하나 이상의 유기 용매를 말한다.

[0064]

용어 "2상 발효 배지"는 발효 배지 (즉, 수성상) 및 적당량의 불수용성 유기 추출용매를 포함하는 2-상의 성장 배지를 말한다.

[0065]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유기상"은 발효 브로쓰를 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜 수득되는 2상 혼합물 중 비-수성상(non-aqueous phase)을 말한다.

[0066]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "수성상"은 수성 발효 배지를 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜서 수득되는 2상 혼합물 중 물을 포함하는 상을 말한다.

[0067]

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "본래 자리에서의 제조물 제거"는 발효와 같은 생물학적 과정으로부터 특정

발효 제조물을 선택적으로 제거하여 생물학적 과정에서의 제조물 농도를 조절하는 것을 의미한다.

[0068] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발효 브로쓰"는 물, 당, 용해된 고체, 혼탁된 고체, 부탄올을 제조하는 미생물, 제조물 부탄올, 및 발효 용기 내에서 유지되는 물질의 모든 다른 구성분의 혼합물을 의미하며, 이 용기 안에서, 제조물 부탄올은 존재하는 미생물에 의해 당이 부탄올, 물 및 이산화탄소(CO_2)로 반응되어서 만들어지고 있다. 발효 브로쓰는 본원에서 기재된 당과 같이 하나 이상의 발효가능한 탄소원을 포함할 수 있다. 발효 브로쓰는 2상 발효성 추출에서 수성상이다. 가끔, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발효 배지"은 "발효 브로쓰"와 동의적으로 사용될 수 있다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발효 용기"는 제조물 부탄올이 당으로부터 만들어지는 발효 반응이 수행되는 용기를 의미한다. 용어 "발효기"는 본원에서 "발효 용기"와 동의적으로 사용될 수 있다.

[0070] 용어 "발효가능한 탄소원"은 본원에서 개시된 미생물에 의해 대사될 수 있는 탄소원을 말한다. 적합한 발효가능한 탄소원에는, 포도당 또는 과당과 같은 단당류; 젖당 또는 설탕과 같은 이당류; 올리고당류; 전분 또는 셀룰로스와 같은 다당류; 1-탄소 기질; 및 이들의 조합이 포함되나, 이에 제한되지 않으며, 이는 발효 배지 내에서 발견될 수 있다. 발효가능한 탄소원에는 재생가능한 탄소, 즉 농업 원료, 조류, 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그노셀룰로스(lignocellulos), 또는 그의 임의의 조합으로부터의 탄소를 비롯해 비-석유-기재의 탄소가 포함된다.

[0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산"은 포화되거나 불포화된, C_7 내지 C_{22} 탄소 원자의 긴 지방족 사슬을 갖는 카르복실산을 말한다.

[0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산 알코올"은 포화되거나 불포화된, C_7 내지 C_{22} 탄소 원자의 긴 지방족 사슬을 갖는 알코올을 말한다.

[0073] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산 알데하이드"는 포화되거나 불포화된, C_7 내지 C_{22} 탄소 원자의 긴 지방족 사슬을 갖는 알데하이드를 말한다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산 아미드"는 포화 또는 불포화된, C_{12} 내지 C_{22} 탄소 원자의 긴 지방족 사슬을 갖는 아미드를 말한다.

[0075] 본원에서 K_p 로서 축약되는 용어 "분배 계수"는 평형상태에서의, 2개의 비혼화성 용매의 혼합물의 2개의 상 내에서의 화합물의 농도의 비를 의미한다. 분배 계수는 2개의 비혼화성 용매 사이의 화합물의 상이한 용해도의 측정값이다. 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "부탄올에 대한 분배 계수"는 추출용매를 포함하는 유기상 및 발효 배지를 포함하는 수성상 사이의 부탄올의 농도 비를 말한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 분배 계수는 용어 분포 계수와 동의어이다.

[0076] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "분리"는 "회수"와 동의어이며, 초기 혼합물 내의 화학적 화합물의 순도 또는 농도보다 더 큰 순도 또는 더 높은 농도의 화합물을 수득하기 위해 초기 혼합물로부터 상기 화합물을 제거하는 것을 말한다.

[0077] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "부탄올 생합성 경로"는 1-부탄올, 2-부탄올, 또는 아이소부탄올을 제조하는 효소 경로를 말한다.

[0078] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "1-부탄올 생합성 경로"는 아세틸-코엔자임 A (아세틸-CoA)로부터 1-부탄올을 제조하는 효소 경로를 말한다.

[0079] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "2-부탄올 생합성 경로"는 피루베이트로부터 2-부탄올을 제조하는 효소 경로를 말한다.

[0080] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "아이소부탄올 생합성 경로"는 피루베이트로부터 아이소부탄올을 제조하는 효소 경로를 말한다.

[0081] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효 적정 농도(effective titer)"는 발효 배지의 리터 당 발효에 의해 제조되는 부탄올의 총 양을 말한다. 부탄올의 총 양은: (i) 발효 배지 내에서의 부탄올의 양; (ii) 유기 추출 용매로부터 회수되는 부탄올의 양; 및 (iii) 기체 스트라이핑이 사용된다면 기체상으로부터 회수되는 부탄올의 양을 포함한다.

- [0082] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효 속도(effective rate)"는 발효 시간 당 발효 매질의 리터 당 발효에 의해 제조되는 부탄올의 총 양을 말한다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효 수율"은 생물촉매에 의해 소모되는 발효가능한 탄소 기질의 단위 당 제조되는 부탄올의 양을 말한다.
- [0084] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "호기성 조건"은 산소의 존재 하의 성장 조건을 의미한다.
- [0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미세호기성 조건"은 낮은 수준(즉, 보통의 대기 중 산소 수준 미만)의 산소가 있는 성장 조건을 의미한다.
- [0086] 용어 "혐기성 조건"은 산소의 부재 하의 성장 조건을 의미한다.
- [0087] 용어 "최소 배지"는 일반적으로 아미노산의 존재 없이 성장될 수 있게 하는 최소 영양분을 함유하는 성장 배지를 말한다. 최소 배지는 전형적으로 발효가능한 탄소원 및 다양한 염을 함유하고, 이는 미생물 및 성장 조건에 따라 다양할 수 있으며; 이들 염은 일반적으로 마그네슘, 질소, 인, 및 황과 같은 필수 원소를 제공하여 미생물이 단백질 및 핵산을 합성할 수 있게 한다.
- [0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "한정 배지(defined media)"는 모든 존재하는 성분, 예를 들어 한정된 탄소원 및 질소원, 및 미생물이 필요로 하는 미량 원소 및 비타민을 공지된 양으로 갖는 성장 배지를 말한다.
- [0089] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "생물융화성(biocompatibility)"은 추출용매의 존재 하에 포도당을 이용하는 미생물의 능력의 측정값을 말한다. 생물융화성 추출용매는 미생물이 포도당을 이용할 수 있도록 허용한다. 비-생물융화성(즉, 생물독성의) 추출용매는 예를 들어, 추출용매가 존재하지 않을 때의 속도의 약 25% 초과의 속도로 미생물이 포도당을 이용하지 못하도록 한다.
- [0090] 용어 "°C"는 셀시우스 도(degrees Celsius)를 의미한다.
- [0091] 용어 "OD"는 광학 밀도를 의미한다.
- [0092] 용어 "OD₆₀₀"은 600nm 파장에서의 광학 밀도를 말한다.
- [0093] 용어 ATCC는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection)(미국 버지니아주 마나сс스(Manassas, VA) 소재)을 말한다.
- [0094] 용어 "sec"는 초(들)를 의미한다.
- [0095] 용어 "min"은 분(들)을 의미한다.
- [0096] 용어 "h"는 시간(들)을 의미한다.
- [0097] 용어 "ml"는 밀리리터(들)를 의미한다.
- [0098] 용어 "L"는 리터를 의미한다.
- [0099] 용어 "g"은 그램을 의미한다.
- [0100] 용어 "mmol"은 밀리몰(들)을 의미한다.
- [0101] 용어 "M"은 몰 농도를 의미한다.
- [0102] 용어 "μl"은 마이크로리터를 의미한다.
- [0103] 용어 "μg"은 마이크로그램을 의미한다.
- [0104] 용어 "μg/ml"은 리터 당 마이크로그램을 의미한다.
- [0105] 용어 "ml/min"은 분 당 밀리리터를 의미한다.
- [0106] 용어 "g/L"는 리터 당 그램을 의미한다.
- [0107] 용어 "g/L/h"는 그램/리터/시간을 의미한다.
- [0108] 용어 "mmol/min/mg"은 밀리몰/분/밀리그램을 의미한다.
- [0109] 용어 "temp"는 온도를 의미한다.

- [0110] 용어 "rpm"은 분당 회전수를 의미한다.
- [0111] 용어 "HPLC"는 고압 액체 크로마토그래피를 의미한다.
- [0112] 용어 "GC"는 기체 크로마토그래피를 의미한다.
- [0113] 본원에서 언급된 모든 공개문헌, 특히, 출원 및 기타 참조문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 표 현상으로 삽입되어 있다. 추가로, 양, 농도, 또는 기타 값이나 파라미터가 범위, 바람직한 범위, 또는 상위 바람직한 값 및 하위 바람직한 값의 목록으로서 주어질 때, 이는 범위가 따로 개시되는가와는 상관없이, 임의의 상위 범위 한계 또는 바람직한 값 및 임의의 하위 범위 한계 또는 바람직한 값 중 임의의 쌍(pair)으로부터 형성되는 모든 범위를 구체적으로 개시하는 것으로서 이해되는 것이다. 달리 언급되지 않는 한, 수치 범위가 본원에서 언급되는 곳에서는 범위가 그의 종점, 및 범위 내의 모든 정수 및 분수를 포함하고자 한다. 본 발명의 범주는 범위를 한정할 때 언급되는 구체적인 값에 제한되는 것은 아니다.
- [0114] 유전자 변형 미생물
- [0115] 부탄을 제조를 위한 미생물 숙주는 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 및 효모로부터 선택될 수 있다. 사용되는 미생물 숙주는 제조되는 부탄을 제조물에 대해 내성이어야 할 것이며, 그래서 수율은 제조물이 숙주에 미치는 독성에 의해 제한되지 않는다. 부탄을 제조를 위한 미생물 숙주의 선택은 하기 상세히 기술된다.
- [0116] 높은 적정 농도 수준의 부탄을에서 대사적으로 활성인 세균은 당업계에 잘 알려져 있지 않다. 부탄-내성 돌연변이체가 용매제조 클로스트리디아(solventogenic Clostridia)로부터 단리되었지만, 기타 잠재적으로 유용한 박테리아 균주의 부탄을 내성에 관해서는 이용할 만한 정보가 거의 없다. 박테리아 내에서 알코올 내성을 비교한 연구의 대부분은 부탄을이 에탄올보다 더욱 독성임을 제안한다(문헌[de Cavalho et al., Microsc. Res. Tech. 64:215-22 (2004)] 및 [Kabelitz et al., FEMS Microbiol. Lett. 220:223-227 (2003)]). 토마스 등(Tomas et al.)(문헌[J. Bacteriol. 186:2006-2018 (2004)])은, 1-부탄을의 수율이 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Clostridium acetobutylicum) 내에서의 발효 동안 부탄을 독성에 의해 제한될 수 있는 것으로 보고한다. 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 미치는 1-부탄을의 1차 효과는 막 기능의 봉괴이다(문헌[Hermann et al., Appl. Environ. Microbiol. 50:1238-1243 (1985)]).
- [0117] 부탄을 제조되는 미생물 숙주는 부탄을에 대해 내성이어야 할 것이고, 하기 기재되는 경로와 같은 도입된 생합성 경로를 사용해 탄수화물을 부탄을로 전환시킬 수 있어야 할 것이다. 적합한 미생물 숙주 선택을 위한 기준에는: 부탄을에 대한 고유 내성(intrinsic tolerance), 높은 속도의 탄수화물 이용, 유전자 조작용 유전적 툴의 이용가능성, 및 안정한 염색체 변경을 발생시키는 능력이 포함된다.
- [0118] 부탄을에 대해 내성이 있는 적합한 숙주 균주는 균주의 고유 내성을 바탕으로 스크리닝함으로써 규명될 수 있다. 세균(microbe)이 부탄을에 대해 갖는 고유 내성은 최소 배지에서 성장될 때 성장 속도를 50% 억제시키는 (IC50) 부탄을의 농도를 결정함으로써 측정될 수 있다. IC50 값은 당업계에 알려진 방법을 사용해 결정될 수 있다. 예를 들어, 흥미있는 세균은 다양한 양의 부탄을의 존재 하에 성장될 수 있고, 성장 속도는 600nm에서 광학 밀도를 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 배가 시간(doubling time)은 성장 곡선의 로그 부분으로부터 계산되고 성장 속도의 측정값으로서 사용될 수 있다. 성장을 50% 억제시키는 부탄을의 농도는 부탄을 농도에 대한(versus) 성장의 억제%의 그래프로부터 결정될 수 있다. 바람직하게는, 숙주 균주는 약 0.5% 초과의 부탄을에 대한 IC50을 가져야 할 것이다. 약 1.5% 초과인, 부탄을에 대한 IC50을 갖는 숙주 균주가 더욱 적합하다. 약 2.5% 초과인, 부탄을에 대한 IC50을 갖는 숙주 균주가 특히 적합하다.
- [0119] 부탄을 제조를 위한 미생물을 숙주는 또한, 포도당 및/또는 기타 탄수화물을 높은 비율로 이용해야 할 것이다. 대부분의 세균은 탄수화물을 이용할 수 있다. 그러나, 소정의 환경적 세균은 탄수화물을 효율적으로 사용할 수 없고, 따라서 적합한 숙주가 안 될 것이다.
- [0120] 숙주를 유전적으로 변형하는 능력은 임의의 재조합 미생물의 제조에 필수적이다. 사용될 수 있는 유전자 이전 기술의 형식(mode)에는 전기천공(electroporation), 접합(conjugation), 형질도입(transduction) 또는 자연적인 형질전환(transformation)이 포함된다. 광범위한 범위의 숙주 접합성 플라스미드 및 약물 내성 마커가 이용 가능하다. 유기체와 함께 사용되는 클로닝 벡터는 숙주 내에서 기능할 수 있는 항생제 내성 마커의 성질을 바탕으로 숙주 유기체에 맞춤된다.
- [0121] 미생물을 숙주는 또한, 다양한 유전자를 불활성화시킴으로써 탄소 유동을 위한 경쟁적 경로를 불활성화시키도록 조작될 수 있다. 이는, 직접적인 불활성화에 대한, 염색체 함입 벡터나 트랜스포존의 이용가능성을 필요로 한

다. 추가로, 화학적 돌연변이를 잘 받을 수 있는 제조물 숙주는 화학적 돌연변이 및 돌연변이체 스크리닝을 통해 고유 부탄을 내성이 개선될 수 있다.

[0122] 탄소 유동을 위한 경쟁적 경로를 불활성화시키는 예로서, 피루베이트 탈카르복실화효소가 감소되거나 제거될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공보 제20090305363호를 참조). 실시 양태에서, 부탄을은 미생물의 주요 제조물이다. 실시 양태에서, 미생물은 아세톤을 제조하지 않는다.

[0123] 상기 기재된 기준을 바탕으로, 부탄을 제조에 적합한 미생물 숙주에는, 자이모모나스, 에스케리키아, 살로넬라, 로도코커스, 슈도모나스, 바실러스, 락토바실러스, 엔테로코커스, 페디오코커스, 알칼리제네스, 클레브시엘라, 파에니바실러스, 아트로박터, 코리네박테리움, 브레비박테리움, 피키아, 칸디다, 한세눌라, 클루이베로마이세스, 이싸트켄키아, 및 사카로마이세스 속의 구성원들이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바람직한 숙주에는, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 알칼리제네스 유트로푸스(*Alcaligenes eutrophus*), 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 파에니바실러스 마세란스(*Paenibacillus macerans*), 로도코커스 에리트로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*), 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 갈리나리움(*Enterococcus gallinarium*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 페디오코커스 아시딜락티시(*Pediococcus acidilactici*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 사카로마이세스 세래비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 포함된다.

[0124] 상기 언급된 미생물은 당업계에 알려진 방법을 사용해, 발효가능한 탄소원을 부탄을, 구체적으로는 1-부탄올, 2-부탄올, 또는 아이소부탄올로 전환시키도록 유전적으로 변형될 수 있다. 적합한 미생물에는 에스케리키아, 락토바실러스, 및 사카로마이세스가 포함된다. 적합한 미생물에는 *E. coli*, *L. plantarum* 및 *S. cerevisiae*가 포함된다. 추가로, 미생물은 브라무치 등(Bramucci et al.)(미국 특허 출원 제11/761497호; 및 제WO 2007/146377호)에 의해 기재된 방법을 사용해 단리되는 상기 열거된 미생물 중 하나의 부탄올-내성 균주일 수 있다. 하나의 그러한 균주의 일례는 락토바실러스 플란타룸 균주 PN0512(ATCC: PTA-7727, 미국 특허 출원 제11/761497호에 대해 2006년 7월 12일에 이루어진 생물학적 기탁물)이다.

[0125] 부탄을 제조에 적합한 생합성 경로는 당업계에 알려져 있고, 소정의 적합한 경로는 본원에서 기재된다. 일부 실시 양태에서, 부탄을 생합성 경로는 숙주 세포에 이종성인 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 부탄을 생합성 경로는 숙주 세포에 이종성인 유전자를 하나 초과로 포함한다. 일부 실시 양태에서, 부탄을 생합성 경로는 생합성 경로의 매 단계에 상응하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 이종성 유전자를 포함한다.

[0126] 마찬가지로, 지시된 기질을 제조물로 전환시키는 것을 촉매시키는 능력이 있는 소정의 적합한 단백질이 본원에서 기재되고, 기타 적합한 단백질이 당업계에 제공된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 제US20080261230호, 제US20090163376호 및 제US20100197519호는 아세토하이드록시산 이성질화환원효소(isomero-reductase)를 기재하고, 2010년 9월 29일에 출원된 미국 출원 일련 번호 제12/893,077호도 마찬가지이며; 미국 특허 출원 공보 제20100081154호는 다이하이드록시산 탈수효소를 기재하며; 알코올 탈수효소는 미국 특허 출원 공보 제US20090269823호 및 미국 특허 가출원 제61/290636호에서 기재된다.

[0127] 미생물은 1-부탄올을 제조하는 1-부탄올 생합성 경로를 함유하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 적합한 변형에는 WO 2007/041269에서 도날드슨(Donaldson) 등에 의해 기재된 것들이 포함된다. 예를 들어, 미생물은 제조물 전환에 대해 하기 효소-촉매화된 기질을 포함하는 1-부탄올 생합성 경로를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다:

[0128] a) 아세틸-CoA에서 아세토아세틸-CoA로;

[0129] b) 아세토아세틸-CoA에서 3-하이드록시부티릴-CoA로;

[0130] c) 3-하이드록시부티릴-CoA에서 크로토닐-CoA로;

[0131] d) 크로토닐-CoA에서 부티릴-CoA로;

[0132] e) 부티릴-CoA에서 부티르알데하이드로; 및

[0133] f) 부티르알데하이드에서 a-부탄올로.

[0134] 미생물은 또한, 2-부탄올 생합성 경로를 발현시켜 2-부탄올을 제조하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 적합한 변형에는 미국 특허 출원 공보 제2007/0259410호 및 제2007/0292927호, 및 PCT 출원 공보 제WO 2007/130518호

및 제WO 2007/130521호에서 도날드슨 등에 의해 기재된 것들이 포함된다. 예를 들어, 한 실시 양태에서, 미생물은 제조물 전환에 대해 하기 효소-촉매화된 기질을 포함하는 2-부탄을 생합성 경로를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다:

[0135] a) 피루베이트에서 알파-아세토락테이트로;

[0136] b) 알파-아세토락테이트에서 아세토인으로;

[0137] c) 아세토인에서 2,3-부탄다이올로;

[0138] d) 2,3-부탄다이올에서 2-부타논으로; 및

[0139] e) 2-부탄온에서 2-부탄올로.

[0140] 미생물은 또한, 아이소부탄을 생합성 경로를 발현시켜 아이소부탄올을 제조하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 적합한 변형에는 미국 특허 출원 공보 제2007/0092957호 및 제WO 2007/050671호에서 도날드슨 등에 의해 기재된 것들이 포함된다. 예를 들어, 미생물은 제조물 전환에 대해 하기 효소-촉매화된 기질을 포함하는 아이소부탄을 생합성 경로를 포함하도록 유전적으로 변형될 수 있다:

[0141] a) 피루베이트에서 아세토락테이트로;

[0142] b) 아세토락테이트에서 2,3-다이하이드록시아이소발레레이트로;

[0143] c) 2,3-다이하이드록시아이소발레레이트에서 α -케토아이소발레레이트로;

[0144] d) α -케토아이소발레레이트에서 아이소부티르알데하이드로; 및

[0145] e) 아이소부티르알데하이드에서 아이소부탄올로.

[0146] 에스케리키아 콜라이 균주는, (a) 하기 유전자에 의해 인코딩되는 아이소부탄을 생합성 경로를 포함할 수 있다: 아세토락테이트 합성효소(서열 목록 번호:2로서 주어짐)를 인코딩하는 클레브시엘라 뉴모니아 유래의 budB(서열 목록 번호:1), 아세토하이드록시산 환원이성질화효소(서열 목록 번호:4로서 주어짐)를 인코딩하는 이. 콜라이 유래의 ilvC(서열 목록 번호:3으로서 주어짐), 아세토하이드록시산 탈수효소(서열 목록 번호:6으로서 주어짐)를 인코딩하는 이. 콜라이 유래의 ilvD(서열 목록 번호:5로서 주어짐), 분지쇄 케토산 탈카르복실화효소(서열 목록 번호:8로서 주어짐)를 인코딩하는 락토코커스 락티스 유래의 kivD(서열 목록 번호:7로서 주어짐), 및 부탄을 탈수효소(서열 목록 번호:10으로서 주어짐)를 인코딩하는 아크로모박터 자일로속시단스 유래의 sadB(서열 목록 번호:9로서 주어짐). 아이소부탄을 생합성 경로의 유전자에 의해 인코딩되는 효소는 상기 기재된 바와 같이, 피루베이트를 아이소부탄올로 전환시키는 제조물 전환으로 기질을 촉매시킨다. 구체적으로는, 아세토락테이트 합성효소는 피루베이트를 아세토락테이트로 전환시키는 것을 촉매시키고, 아세토하이드록시산 환원이성질화효소는 아세토락테이트를 2,3-다이하이드록시아이소발레레이트로 전환시키는 것을 촉매시키고, 아세토하이드록시산 탈수효소는 2,3-다이하이드록시아이소발레레이트를 α -케토아이소발레레이트로 전환시키는 것을 촉매시키고, 분지쇄 케토산 탈카르복실화효소는 α -케토아이소발레레이트를 아이소부티르알데하이드로 전환시키는 것을 촉매시키고, 부탄을 탈수효소는 아이소부티르알데하이드를 아이소부탄올로 전환시키는 것을 촉매시킨다. 이러한 재조합 에스케리키아 콜라이 균주는 당업계에 알려지고/지거나(미국 특허 출원 제12/478,389호 및 제12/477,946호를 참조) 본원 하기에서 기재된 방법을 사용해 구축될 수 있다. 적합한 균주는 본원에서 기재된 단백질 서열과 적어도 약 70% 내지 75%의 동일성, 적어도 약 75% 내지 80%, 적어도 약 80% 내지 85%의 동일성, 또는 적어도 약 85% 내지 90%의 동일성을 갖는 서열을 포함하도록 구축될 수 있는 것으로 고려된다.

[0147] 에스케리키아 콜라이 균주는, 아이소부탄을 제조를 제한하는 경쟁적 경로를 제거하기 위해 하기 유전자인, (피루베이트 포르메이트 리아제를 인코딩하는) 서열 목록 번호: 71로서 주어지는 pf1B, (락테이트 탈수효소를 인코딩하는) 서열 목록 번호: 73으로서 주어지는 IdhA, (알코올 탈수효소를 인코딩하는) 서열 목록 번호: 77로서 주어지는 adhE, (푸마레이트 환원효소를 인코딩하는) frdABCD 오페론을 포함하는 적어도 하나의 유전자, 구체적으로는 서열 목록 번호: 90으로서 주어지는 frdA, 서열 목록 번호: 75로서 주어지는 frdB, 서열 목록 번호: 92로서 주어지는 frdC, 및 서열 목록 번호: 94로서 주어지는 frdD의 결실을 포함할 수 있다.

[0148] 사카로마이세스 세레비시애 균주는, 하기 유전자에 의해 인코딩되는 아이소부탄을 생합성 경로를 포함할 수 있다: 아세토락테이트 합성효소(서열 목록 번호:12)를 인코딩하는 바실러스 서브틸리스 유래의 alsS 코딩 영역(서열 목록 번호:11), 아세토하이드록시산 환원이성질화효소(KARI; 서열 목록 번호:14)를 인코딩하는 S. 세레비시애 유래의 ILV5(서열 목록 번호:13), 및/또는 Pf5.IlvC-Z4B8에 의해 인코딩되는 것과 같은 돌연변이체 KARI(서

열 목록 번호: 15; 단백질 서열 목록 번호: 16), 아세토하이드록시산 탈수효소(서열 목록 번호: 18)를 인코딩하는 스트렙토코커스 뮤탄스 유래의 *i1vD*(서열 목록 번호: 17), 분지쇄 케토산 탈카르복실화효소(서열 목록 번호:20)를 인코딩하는 바실러스 서브틸리스 유래의 *kivD*(서열 목록 번호: 19로서 주어지는 코돈 최적화된 서열), 및 부탄올 탈수효소(서열 목록 번호:10)를 인코딩하는 아크로모박터 자일로속시단스 유래의 *sadB*(서열 목록 번호:9). 아이소부탄을 생합성 경로의 유전자에 의해 인코딩되는 효소는 본원에서 기재된 바와 같이 기질을 제조물 전환으로 촉매시켜, 피루베이트를 아이소부탄올로 전환시킨다. 적합한 균주는 본원에서 기재된 단백질 서열에 대해 적어도 약 70% 내지 75% 동일성, 적어도 약 75% 내지 80%, 적어도 약 80% 내지 85% 동일성, 또는 적어도 약 85% 내지 90%의 동일성을 갖는 서열을 포함하도록 구축될 수 있다.

[0149] 세포기질 내에서의 아세토락테이트 합성효소(ALS) 활성 및 내인성 피루베이트 탈카르복실화효소(PDC) 유전자의 결실을 갖는 아이소부탄올 경로를 발현하는 효모 균주는 미국 특허 출원 제12/477,942호에 기재되어 있다. 세포기질의 ALS 및 감소된 PDC 발현의 이러한 조합은 피루베이트로부터 아세토락테이트로의 흐름(flux)을, 그런 다음 아이소부탄올 제조 경로로의 유동을 크게 증가시키는 것으로 발견되었다. 그러한 재조합 사카로마이세스 세레비시애 균주는 당업계에 알려지고/지거나 본원에서 기재된 방법을 사용해 구축될 수 있다. 다른 적합한 효모 균주는 당업계에 알려져 있다. 추가의 예는 미국 가출원 일련 번호 제61/379546호, 제61/380563호, 및 미국 출원 일련 번호 제12/893089호에서 제공된다.

[0150] 본원에서 제공된 과정과 함께 사용되는 미생물에 적합한 추가의 변형에는, 미국 특허 출원 공보 제20090305363호에서 기재된 바와 같이 글리세롤-3-포스페이트 탈수효소 활성을 감소시키는 변형, 미국 특허 출원 공보 제20100120105호에서 기재된 바와 같이 등가(equivalents balance)를 감소시키거나 엔트너-도우도로프(Entner-Doudoroff) 경로를 통해 증가된 탄소 흐름을 제공하는 숙주 세포에 가해지는 변형이 포함된다. 이종성 단백질의 활성을 위해 Fe-S 클러스터의 결합을 필요로 하는 이러한 단백질의 활성이 증가된 효모 균주는 미국 출원 공보 제20100081179호에 기재되어 있다. 다른 변형에는, 미국 가출원 제61/290,639호에서 기재된 이중-역할의 헥소키나아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 내인성 폴리뉴클레오타이드에서의 변형, 미국 가출원 제61/380563호에서 기재된 피루베이트-이용하는 생합성 경로에서의 단계를 촉매시키는 폴리펩타이드를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드의 함입이 포함된다.

[0151] 추가로, Fe-S 클러스터 생합성에 영향을 미치는 폴리펩타이드를 인코딩하는 내인성 유전자에서 적어도 하나의 결실, 돌연변이, 및/또는 치환을 포함하는 숙주 세포는 미국 특허 가출원 제61/305333호에서 기재되어 있고, 포스포케톨라제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 이종성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포 및 포스포트랜스아세틸라아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 이종성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포는 미국 특허 가출원 제61/356379호에서 기재되어 있다.

[0152] 적합한 효모 균주의 구축

[0153] NGI-049는 적합한 사카로마이세스 세레비시애 균주의 한 예이다. NGI-049는 내인성 PDC1, PDC5, 및 PDC6 유전자의 삽입-불활성화를 갖고 있고, 발현 벡터 *pLH475-Z4B8* 및 *pLH468*을 함유하는 균주이다. PDC1, PDC5, 및 PDC6 유전자는 피루베이트 탈카르복실화효소의 3개의 주요 아이소아임(isosyme)을 인코딩한다. 균주는 플라스미드 상에서 또는 함입되는 아이소부탄올 생합성 경로에 대한 효소를 인코딩하는 유전자를 발현한다. NGI-049 균주의 구축이 본원에서 제공된다.

[0154] 효모 내 내인성 피루베이트 탈카르복실화효소 활성은 피루베이트를 아세트알데하이드로 전환시키고, 그런 다음, 아세트알데하이드로는 에탄올로 또는 아세테이트를 통해 아세틸-CoA로 전환된다. 따라서, 내인성 피루베이트 탈카르복실화효소 활성은 부산물 형성에 의한 감소 또는 제거의 표적이다.

[0155] 피루베이트 탈카르복실화효소를 인코딩하는 유전자의 봉괴로 인해 피루베이트 탈카르복실화효소 활성이 감소된 다른 효모 균주의 예는 플리퀴어트(Flikweert) 등에서 사카로마이세스(문헌[Yeast (1996) 12:247-257])에 대해, 비안키(Bianchi) 등에서 클루이베로마이세스(문헌[Mol. Microbiol. (1996) 19(1):27-36])에 대해서와 같이 보고되었고, 호흐만(Hohmann)에서 조절 유전자의 봉괴(문헌[Mol Gen Genet. (1993) 241:657-666])에 대해 보고되었다. 피루베이트 탈카르복실화효소 활성이 없는 사카로마이세스 균주는 ATCC(수탁 번호 #200027 및 #200028)로부터 입수 가능하다.

[0156] *pdc6::GPMp1-sadB* 통합 카세트의 구축 및 PDC6 결실:

[0157] *pRS425::GPM-sadB*(서열 목록 번호: 63) 유래의 GPM-sadB-ADHt 절편(서열 목록 번호:21)을 *pUC19-URA3r* 유래의 *URA3r* 유전자에 접합함으로써 *pdc6::GPMp1-sadB-ADH1t-URA3r* 통합 카세트를 만들었다. *pUC19-URA3r*(서열 목록

번호:22)은 75bp 상동성 반복 서열에 의해 플랭크된(flanked) pRS426(ATCC # 77107) 유래의 URA3 마커를 함유해서, 생체 내에서의 상동성 재조합 및 URA3 마커의 제거를 허용한다. 퓨전 DNA 폴리머라아제(Phusion DNA polymerase)(미국 마이애미주 베버리(Beverly, MA) 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스 인코포레이티드(New England Biolabs Inc.); 카탈로그 번호 F-540S), 및 프라이머 114117-11A 내지 114117-11D(서열 목록 번호:23, 24, 25 및 26) 및 114117-13A 및 114117-13B(서열 목록 번호:27 및 28)와 함께, pRS425::GPM-sadB 및 pUC19-URA3r 플라스미드 DNA를 주형으로서 사용하는 SOE PCR(문헌[Horton et al. (1989) Gene 77:61-68]에 의해 기재된 바와 같음)에 의해 2개의 DNA 절편을 접합하였다.

[0158] SOE PCR을 위한 외부의 프라이머(114117-13A 및 114117-13B)는 제각기 PDC6 프로모터 및 종결자의 업스트림 및 다운스트림 영역에 상동성인 5' 및 3'의 대략 50bp 영역을 함유하였다. 완성된 카세트 PCR 단편을 BY4700(ATCC # 200866)내로 형질전환시켰고, 형질전환체는 30°C에서 우라실이 결여되어 있고 2% 포도당이 보충된 합성 완전 배지 상에서 표준 유전자 기술을 사용해 유지시켰다(문헌[Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202]). 프라이머 112590-34G 및 112590-34H(서열 목록 번호:30 및 31), 그리고 112590-34F 및 112590-49E(서열 목록 번호: 29 및 32)를 사용한 PCR에 의해 형질전환체를 스크리닝하여, PDC6 코딩 영역이 결실된 PDC6 좌(locus)에서의 함입을 입증하였다. 표준 프로토콜에 따라, 30°C에서 2% 포도당 및 5-FOA가 보충된 합성 완전 배지 상에 플레이팅함으로써 URA3r 마커를 재활용하였다. 5-FOA 플레이트 유래의 콜로니를 SD-URA 배지 상에 패칭(patching)함으로써 마커 제거를 확인하여, 성장의 부재(absence)를 입증하였다. 생성 규명된 균주는 유전형: BY4700 pdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t를 갖는다.

pdc1::PDC1-i1vD 통합 카세트의 구축 및 PDC1 결실:

[0160] 퓨전 DNA 폴리머라아제(미국 마이애미주 베버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스 인코포레이티드; 카탈로그 번호 F-540S), 및 프라이머 114117-27A 내지 114117-27D(서열 목록 번호:34, 35, 36 및 37)와 함께 주형으로서 pLH468 및 pUC19-URA3r 플라스미드 DNA를 사용하여 SOE PCR(문헌[Horton et al. (1989) Gene 77:61-68]에 기재)에 의해 pLH468 유래의 i1vD-FBA1t 절편(서열 목록 번호: 33)을 pUC19-URA3r 유래의 URA3r 유전자에 연결시켜, pdc1::PDC1p-i1vD-FBA1t-URA3r 통합 카세트를 만들었다.

[0161] SOE PCR을 위한 외부의 프라이머(114117-27A 및 114117-27D)는 제각기 PDC1 프로모터의 다운스트림 및 PDC1 코딩 서열의 다운스트림 영역에 상동성인 5' 및 3'의 대략 50bp 영역을 함유하였다. 완성된 카세트 PCR 단편을 BY4700 pdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t 내로 형질전환시켰고, 형질전환체는 30°C에서 우라실이 결여되어 있고 2% 포도당이 보충된 합성 완전 배지 상에서 표준 유전자 기술을 사용해 유지시켰다(문헌[Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202]). 프라이머 114117-36D 및 135(서열 목록 번호:38 및 39), 그리고 프라이머 112590-49E 및 112590-30F(서열 목록 번호: 32 및 40)를 PDC1p 사용한 PCR에 의해 형질전환체를 스크리닝하여, PDC1 코딩 영역이 결실된 PDC1 좌(locus)에서의 함입을 입증하였다. 표준 프로토콜에 따라, 30°C에서 2% 포도당 및 5-FOA가 보충된 합성 완전 배지 상에 플레이팅함으로써 URA3r 마커를 재활용하였다. 5-FOA 플레이트 유래의 콜로니를 SD-URA 배지 상에 패칭함으로써 마커 제거를 확인하여, 성장의 부재를 입증하였다. 생성 규명된 균주인 "NYLA67"은 유전형: BY4700 pdc6::P_{GPM1}-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-i1vD-FBA1t를 갖는다.

HIS3 결실

[0162] 내인성 HIS3 코딩 영역을 결실시키기 위해, his3::URA3r2 카세트를 URA3r2 주형 DNA(서열 목록 번호: 41)로부터 PCR-증폭시켰다. URA3r2는 500bp 상동성 반복 서열에 의해 플랭크된 pRS426 (ATCC # 77107) 유래의 URA3 마커를 함유하여, 생체 내 상동성 재조합 및 URA3 마커의 제거를 허용한다. 퓨전 DNA 폴리머라아제 및 프라이머 114117-45A와 114117-45B(서열 목록 번호: 42 및 43)를 사용해 PCR을 수행하였고, 이는 약 2.3kb PCR 제조물을 발생시켰다. 각각의 프라미어의 HIS3 부위를 HIS3 프로모터의 5' 업스트림 영역 및 코딩 영역의 3' 다운스트림 영역으로부터 유도하여서, URA3r2 마커의 함입이 HIS3 코딩 영역을 대체하게 하였다. 표준 유전자 기술을 사용해 PCR 제조물을 NYLA67로 형질전환시켰다(문헌[Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202]), 30°C에서 우라실이 결여되어 있고 2% 포도당이 보충된 합성 완전 배지 상에서 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체를 스크리닝하여, 30°C에서 히스티дин이 결여되어 있고 2% 포도당이 보충된 합성 완전 배지 상으로 형질전환체를 레플리카 플레이팅(replica plating)하여 올바른 함입을 입증하였다. 표준 프로토콜에 따라, 30°C에서 2% 포도당 및 5-FOA가 보충된 합성 완전 배지 상으로 플레이팅함으로써 URA3r 마커를 재활용하였다. 5-FOA 플레이트로부터 SD-URA 배지 상으로 콜로니를 패칭함으로써 마커 제거를 확인하여, 성장의 부재를 입증하였다. 생성 규명된 균주 "NYLA73"은 유전자형: BY4700

pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-i1vD-FBA1t Δhis3을 갖는다.

[0164] pdc5::kanMX 통합 카세트의 구축 및 PDC5 결실:

퓨전 DNA 폴리머라아제 및 프라이머 PDC5::KanMXF와 PDC5::KanMXR(서열 목록 번호:44 및 45)을 사용해 균주 YLR134W 염색체 DNA(ATCC No. 4034091)로부터 pdc5::kanMX4 카세트를 PCR-증폭시켰고, 이는 약 2.2kb PCR 제조물을 발생시켰다. 각각의 프라이머의 PDC5 부분을 PDC5 프로모터의 5' 업스트림 영역 및 코딩 영역의 3' 다운스트림 영역으로부터 유도하여, kanMX4 마커의 함입이 PDC5 코딩 영역을 대체하도록 하였다. 표준 유전자 기술을 사용해 PCR 제조물을 NYLA73 내로 형질전환시켰고(문헌[Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202]), 30°C에서 1% 에탄올 및 제네티신 (geneticin)(200 μ g/ml)이 보충된 YP 배지 상에서 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체를 PCR에 의해 스크리닝 하여, 프라이머 PDC5koFor 및 N175(서열 목록 번호: 46 및 47)를 사용하여 PDC5 코딩 영역이 대체된 PDC 좌에서의 올바른 함입을 입증하였다. 규명된 올바른 형질전환체는 유전자형: BY4700 pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-i1vD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4를 갖는다.

[0166] pLH475-Z4B8 구축

효모 내에서의 ALS 및 KARI 발현을 위해 pLH475-Z4B8 플라스미드(서열 목록 번호:48)를 구축하였다. pLH475-Z4B8은 하기 키메라 유전자를 함유하는 pH81 벡터(ATCC #87541)이다:

1) CUP1 프로모터(서열 목록 번호: 49), 바실러스 서브틸리스 유래의 아세토락테이트 합성효소 코딩 영역(AIsS; 서열 목록 번호: 11; 단백질 서열 목록 번호: 12), 및 CYC1 종결자(CYC1-2; 서열 목록 번호: 50);

2) ILV5 프로모터(서열 목록 번호:51), Pf5.I1vC-Z4B8 코딩 영역(서열 목록 번호: 15; 단백질 서열 목록 번호: 16), 및 ILV5 종결자(서열 목록 번호:52); 및 3) FBA1 프로모터(서열 목록 번호: 53), S. 세레비시애 KARI 코딩 영역(ILV5; 서열 목록 번호: 13; 단백질 서열 목록 번호:14), 및 CYC1 종결자(서열 목록 번호: 54).

Pf5.I1vC-Z4B8 코딩 영역은 미국 특허 출원 공보 제US20090163376호에서 기재된, 슈도모나스 플루오레센스 (Pseudomonas fluorescens) 유래의 KARI를 인코딩하나 돌연변이를 함유하는 서열이다. Pf5.I1vC-Z4B8에 의해 인코딩된 KARI(서열 목록 번호:16)는 천연 슈도모나스 플루오레센스 KARI와 비교해 하기 아미노산 변화를 갖는다:

[0171] C33L: 위치 33에서 시스테인이 루신으로 변화,

[0172] R47Y: 위치 47에서 아르기닌이 티로신으로 변화,

[0173] S50A: 위치 50에서 세린이 알라닌으로 변화,

[0174] T52D: 위치 52에서 트레오닌이 아스파라긴으로 변화,

[0175] V53A: 위치 53에서 발린이 알라닌으로 변화,

[0176] L61F: 위치 61에서 루신이 페닐알라닌으로 변화,

[0177] T80I: 위치 80에서 트레오닌이 아이소루신으로 변화,

[0178] A156V: 위치 156에서 알라닌이 트레오닌으로 변화 및

[0179] G170A: 위치 170에서 글리신이 알라닌으로 변화.

[0180] 사카로마이세스 세레비시애 내에서의 발현에 대해 최적화된 코돈을 바탕으로 한 DNA 2.0(미국, 캘리포니아주, 팔로알토(Palo Alto, CA) 소재; 서열 목록 번호:15)에 의해 Pf5.I1vC-Z4B8 코딩 영역을 합성하였다.

[0181] 발현 벡터 pLH468

[0182] 효모에서의 DHAD, KivD 및 HADH의 발현을 위해 pLH468 플라스미드 (서열 번호 55)를 구축하였다.

B. 서브틸리스 케토아이소발레레이트 탈카르복실화효소(KivD) 및 말간 알코올 탈수소효소(HADH)를 위한 코딩 영역은 사카로마이세스 세레비시애에서의 발현에 최적화된 코돈(제각기 서열 목록 번호:19 및 56)을 바탕으로 DNA2.0에 의해 합성되었고, 플라스미드 pKivDy-DNA2.0 및 pHadhy-DNA2.0에서 제공되었다. 인코딩된 단백질은 제각기 서열 목록 번호 20 및 57이다. KivD 및 HADH에 대한 개별적인 발현 벡터를 구축하였다. pLH467 (pRS426::P_{GPD1}-kivDy-GPD1t)을 조립하기 위해, 벡터 pNY8(서열 목록 번호:58; 미국 특허 출원 공보 제

US20080182308호의 실시예 17에서 기재되며, 또한 pRS426.GPD-ald-GPDt라고도 불림)을 AscI 및 SfiI 효소를 사용해 분해해서, GPD1 프로모터(서열 목록 번호: 59) 및 ald 코딩 영역을 삭제하였다. pNY8 유래의 GPD1 프로모터 단편(GPD1-2; 서열 목록 번호: 60)을 PCR 증폭시켜서, 5' 프라이머 OT1068 및 3' 프라이머 OT1067(서열 목록 번호: 61 및 62)을 사용해 5' 말단에 AscI 부위를, 그리고 3' 말단에 SpeI 부위를 추가하였다. AscI/SfiI 분해된 pNY8 벡터 단편을, AscI 및 SpeI를 이용해 분해된 GPD1 프로모터 PCR 제조물, 및 벡터 pKivD-DNA2.0으로부터 단리된 코돈 최적화된 kivD 코딩 영역을 함유하는 SpeI-SfiI 단편과 연결하였다. 삼중 연결은 벡터 pLH467(pRS426::P_{GPD1}-kivDy-GPD1t)를 발생시켰다. pLH467은 제한 맵핑(restriction mapping) 및 서열화에 의해 입증되었다.

[0184] pLH435 pRS425::P_{GPM1}-Hadhy-ADH1t)는 미국 특허 출원 제12/477942호의 실시예 3에서 기재된 벡터 pRS425::GPM-sadB(서열 목록 번호:63)로부터 유도되었다. pRS425::GPM-sadB는 GPM1 프로모터(서열 목록 번호:64), 아크로모박터 자일로속시단스의 부탄을 탈수소효소 유래의 코딩 영역(sadB; 서열 목록 번호: 9; 단백질 서열 목록 번호:10: 미국 특허 출원 공보 제US20090269823호에서 개시됨), 및 ADH1 종결자(서열 목록 번호:65)를 함유하는 키메라 유전자가 있는 pRS425 벡터(ATCC #77106)이다. pRS425::GPMp-sadB는 제각기 sadB 코딩 영역의 5' 및 3' 말단에서 BbvI 및 PacI 부위를 함유한다. NheI 부위는 프라이머 OT1074 및 OT1075(서열 목록 번호:66 및 67)를 사용해 부위-직접적 돌연변이에 의해 sadB 코딩 영역의 5' 말단에 첨가되어, 서열화에 의해 입증되었던 벡터 pRS425-GPMp-sadB-NheI를 발생시켰다. pRS425::P_{GPM1}-sadB-NheI는 NheI 및 PacI를 사용해 분해되어, sadB 코딩 영역을 떨어 뜨렸고, 벡터 pHadhy-DNA2.0 유래의 코돈 최적화된 HADH 코딩 영역을 함유하는 NheI-PacI 단편과 연결되어 pLH435를 만들었다.

[0185] 단일 벡터 내에서 KivD 및 HADH 발현 카세트를 조합하기 위해, 효모 벡터 pRS411(ATCC # 87474)은 SacI 및 NotI를 이용해 분해되었고, P_{GPD1}-kivDy-GPD1t 카세트를 함유하는 pLH467 유래의 SacI-SalI 단편과, P_{GPM1}-Hadhy-ADH1t 카세트를 함유하는 pLH435 유래의 SalI-NotI 단편과 함께 삼중 연결 반응으로 연결되었다. 이는 벡터 pRS411::P_{GPD1}-kivDy-P_{GPM1}-Hadhy (pLH441)를 제공하였고, 제한 맵핑에 의해 입증되었다.

[0186] 저급 아이소부탄을 경로에 있는 모든 3개의 유전자: i1vD, kivDy 및 Hadhy에 대한 공동발현 벡터를 발생시키기 위해, 본 발명자들은 미국 특허 출원 제12/569636호에서 기재된 pRS423 FBA i1vD(Strep)(서열 목록 번호:68)를 I1vD 유전자의 공급원으로서 사용하였다. 이 셔틀 벡터는 이. 콜라이에서 유지를 위한 F1 복제 기원(nt 1423 내지 1879), 및 효모에서 복제를 위한 2마이크론 기원(nt 8082 내지 9426)을 함유한다. 벡터는 FBA 프로모터 (nt 2111 내지 3108; 서열 목록 번호: 53) 및 FBA 종결자(nt 4861 내지 5860; 서열 목록 번호: 69)를 갖는다. 또한, 이는 효모에서의 선별을 위한 His 마커(nt 504 내지 1163)를, 그리고 이. 콜라이에서의 선별을 위한 앰피실린 내성 마커(nt 7092 내지 7949)를 갖고 있다. 스트렙토코커스 뮤탄스 UA159 (ATCC #700610) 유래의 i1vD 코딩 영역(nt 3116 내지 4828; 서열 목록 번호: 17; 단백질 서열 목록 번호: 18)은 발현용 키메라 유전자를 형성하는 FBA 프로모터 및 FBA 종결자 사이에 존재한다. 또한, i1vD 코딩 영역(nt 4829 내지 4849)에 융합되는 루미오 태그(lumio tag)가 존재한다.

[0187] 제1 단계는, pRS423 FBA i1vD(Strep)(또한,pRS423-FBA(SpeI)-I1vD(스트렙토코커스 뮤탄스)-Lumio라고 불림)를 SacI 및 SacII(T4 DNA 폴리미라아제를 사용해 SacII 부위가 블런트 말단된 것)로 선형으로 만들어서, 총 길이가 9,482bp인 벡터를 제공하는 것이었다. 제2 단계는, SacI 및 KpnI(T4 DNA 폴리미라아제를 사용해 KpnI 부위가 블런트 말단된 것)로 pLH441로부터 kivDy-hADHy 카세트를 단리하여, 6,063bp 단편을 제공하는 것이었다. 이 단편을 pRS423-FBA(SpeI)-I1vD(스트렙토코커스 뮤탄스)-Lumio 유래의 9,482bp 벡터 단편과 연결하였다. 이는 벡터 pLH468(pRS423::P_{FBA1}-i1vD(Strep)Lumio-FBA1t-P_{GPD1}-kivDy-GPD1t-P_{GPM1}-hadhy-ADH1t)을 발생시켰고, 이는 제한 맵핑 및 서열화에 의해 확인되었다.

[0188] 표준 유전 기술(문헌[Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY])을 사용하여 플라스미드 벡터 pLH468 및 pLH475-Z4B8을 균주 BY4700 pdc6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-i1vD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4에 동시에 형질전환시켰고, 생성 균주를 30℃에서 히스티딘 및 우라실이 결여되고, 1% 에탄올이 보충된 합성 완전 배지 상에 유지시켰다. 생성 균주를 NGI-049라고 명명하였다.

유기 추출용매

[0190] 추출용매는, 발효 브로쓰로부터 부탄을 추출하는데 있어서 추출용매가 유용하도록 하는 특징을 갖는 불수용성 유기 용매 또는 용매 혼합물이다. 적합한 유기 추출용매는 부탄을 제조 또는 회수를 위한 시판의 2-상 추출성

발효용 이상적인 용매의 기준을 충족해야 할 것이다. 구체적으로는, 추출용매는 (i) 미생물, 예를 들어 에스카리키아 콜라이, 락토바실러스 플란타룸, 및 사카로마이세스 세레비시애와 생물융화성이이고, (ii) 발효 배지와는 실질적으로 비혼화성이이고, (iii) 부탄을 추출을 위해 높은 분배 계수(K_p)를 갖고, (iv) 영양분의 추출을 위해 낮은 분배 계수를 갖고, (v) 발효 배지와 함께 에멀젼을 형성하는 경향이 낮고, 그리고 (vi) 가격이 낮고 유해하지 않아야 할 것이다. 또한, 개선된 과정 작동성 및 경제성을 위해, 추출용매는 (vii) 낮은 점도(μ)를 갖고, (viii) 수성 발효 배지에 비해 낮은 밀도(ρ)를 갖고, (ix) 추출용매 및 부탄을의 다운스트림 분리에 적합한 비등점을 가져야 할 것이다.

[0191]

한 실시 양태에서, 추출용매는 미생물과 생물융화성이일 수 있는데, 즉, 미생물에 대해 비독성이거나 미생물이 허용가능한 수준으로 손상될 정도로만 독성이어서, 미생물이 계속해서 부탄을 제조물을 발효 배지 내로 제조한다. 추출용매의 생물융화성의 범위는 정의된 발효 조건 하에서 측정되는 바와 같이, 추출용매 및 부탄을 제조물의 존재 하에 미생물의 포도당 이용 속도에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 가출원 제61/168,640호; 제61/168,642호; 및 제61/168,645호의 실시예를 참조한다. 생물융화성 추출용매는 미생물이 포도당을 이용하게 하는 한편, 비-생물융화성 추출용매는, 미생물이 포도당을 예를 들어, 추출용매가 존재하지 않을 때의 속도의 약 25% 초과의 속도로는 이용하지 못하게 한다. 발효 제조물 부탄을의 존재가 추출용매에 대한 미생물의 민감성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 발효 제조물은 추출용매의 생물융화성 테스트 동안에 존재해야 할 것이다. 추가의 발효 제조물, 예를 들어 에탄올의 존재는 추출용매의 생물융화성에 유사하게 영향을 미칠 수 있다. 생물융화성 추출용매의 사용은, 미생물을 포함하는 발효 브로쓰를 유기 추출용매와 함께 접촉시킨 후에 부탄을 계속해서 제조하는 것이 바람직한 과정에 바람직하다.

[0192]

한 실시 양태에서, 추출용매는 C_7 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_7 내지 C_{22} 지방산, C_7 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 적합한 추출용매의 예에는, 올레일 알코올, 베헤닐 알코올, 세틸 알코올, 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 스테아릴 알코올, 올레산, 라우르산, 미리스트산, 스테아르산, 메틸 미리스테이트, 메틸 올레이트, 라우릭 알데하이드, 1-노난올, 1-데칸올, 1-운데칸올, 2-운데칸올, 1-노나날, 2-부틸옥탄올, 2-부틸-옥탄산, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 용매를 포함하는 추출용매가 포함된다. 실시 양태에서, 추출용매는 올레일 알코올을 포함한다. 실시 양태에서, 추출용매는 분지쇄 포화 알코올, 예를 들어, 아이소팔[®] 12(ISOFAL[®] 12)(미국 텍사스주 휴스턴(Houston, TX) 소재의 사솔(Sasol)) 또는 샤클 I-12(Jarcol I-12)(미국 뉴저지주 뉴워크(Newark, NJ) 소재의 샤클 인더스트리즈, 인코포레이티드(Jarchem Industries, Inc.))로서 시판되는 2-부틸옥탄올을 포함한다. 실시 양태에서, 추출용매는 분지쇄 카르복실산, 예를 들어, 제각기 아이소카르브[®] 12(ISOCARB[®] 12), 아이소카르브[®] 16, 및 아이소카르브[®] 24(미국 텍사스주 휴스턴 소재의 사솔)로서 시판되는 2-부틸-옥탄산, 2-헥실-데칸산, 또는 2-데실-테트라데칸산을 포함한다.

[0193]

한 실시 양태에서, 제1 불수용성 유기 추출용매는 C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_{12} 내지 C_{22} 지방산, C_{12} 내지 C_{22} 지방산의 에스테르, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_{12} 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 적합한 제1 추출용매는 추가로, 올레일 알코올, 베헤닐 알코올, 세틸 알코올, 1-도데칸올이라고도 하는 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 스테아릴 알코올, 올레산, 라우르산, 미리스트산, 스테아르산, 메틸 미리스테이트, 메틸 올레이트, 라우릭 알데하이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 실시 양태에서, 추출용매는 올레일 알코올을 포함할 수 있다.

[0194]

한 실시 양태에서, 임의의 제2 불수용성 유기 추출용매는 C_7 내지 C_{22} 지방산 알코올, C_7 내지 C_{22} 지방산 카르복실산, C_7 내지 C_{22} 지방산 카르복실산의 에스테르, C_7 내지 C_{22} 지방산 알데하이드, C_7 내지 C_{22} 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 적합한 제2 추출용매는 추가로, 1-노난올, 1-데칸올, 1-운데칸올, 2-운데칸올, 1-노나날, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 실시 양태에서, 제2 추출용매는 1-데칸올을 포함한다.

[0195]

한 실시 양태에서, 제1 추출용매는 올레일 알코올을 포함하고, 제2 추출용매는 1-데칸올을 포함한다.

[0196]

제1 추출용매 및 제2 추출용매가 사용될 때, 각각의 상대적인 양은 적합한 범위 내에서 다양할 수 있다. 예를 들어, 제1 추출용매는 제1 추출용매 및 제2 추출용매의 조합된 부피의 약 30% 내지 약 90%, 또는 약 40% 내지 약 80%, 또는 약 45% 내지 약 75%, 또는 약 50% 내지 약 70%인 양으로 사용될 수 있다. 최적의 부피는 추출용매의 특징, 예를 들어 부탄올에 대한 상대적으로 높은 분배 계수를 허용가능할 만한 수준의 생물융화성과 균형

을 이루는 것을 최대화하는 것을 반영한다. 부탄올의 제조 또는 회수를 위한 2-상 추출성 발효에 있어서, 온도, 접촉 시간, 발효 배지 내의 부탄올 농도, 추출용매 및 발효 배지의 상대적인 양, 사용되는 특정 제1 추출용매 및 제2 추출용매, 제1 추출용매 및 제2 추출용매의 상대적인 양, 기타 유기 용질의 존재, 전해질의 존재 및 농도, 및 미생물의 양과 유형은 관련되어 있고; 그래서, 이를 변수는 본원에서 기재된 바와 같은 추출 과정을 최적화시키기 위해 적절한 제한 내에서 필요한 대로 조정될 수 있다.

[0197] 적합한 유기 추출용매는 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트 루이스(St. Louis, MO) 소재)와 같은 다양한 공급원으로부터 다양한 등급으로 시판될 수 있으며, 이 중 많은 것은 부탄올을 제조하거나 회수하는 추출성 발효에서 사용하기에 적합할 수 있다. 공업용 등급의 용매는 목적하는 성분, 및 고급 및 저급 분자량 성분을 비롯하여 화합물을 혼합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 하나의 시판의 공업용 등급 올레일 알코올은 약 65% 올레일 알코올, 및 고급 및 저급 지방산 알코올의 혼합물을 함유한다.

[0198] 전해질

[0199] 본 발명의 방법에 따라, 발효 배지는 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄을 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 적어도 하나의 전해질을 함유한다. 전해질은 기본 발효 배지 내에 함유된 하나 이상의 염을 포함할 수 있고, 이 경우에 전해질은 기본 발효 배지 내에 함유되는 총 염의 농도의 것보다 더 높은 농도로 존재한다. 전해질은 기본 발효 배지 내에 존재하지 않는 하나 이상의 염을 포함할 수 있다. 기본 발효 배지는 예를 들어, 포스페이트, 마그네슘, 및/또는 암모늄 염을 함유할 수 있고, 일반적으로 특정 미생물에 맞춰진다. 기본 발효 배지의 제안된 조성물은 디프코™ & BBL™ 매뉴얼(Difco™ & BBL™ manual)(미국 메릴랜드주 21152 스파스(Sparks, MD 21152, USA) 소재의 벡튼 딕킨슨 앤드 컴퍼니(Becton Dickinson and Company))에서 찾을 수 있다. 일반적으로, 미량 원소에 의해 제공되는 염은 그의 극도로 낮은 농도로 인해 기본 발효 배지의 총 염 농도의 계산에서 무시될 수 있다.

[0200] 전해질은 발효 배지 내에서, 또는 2상 발효 배지의 수성상 내에서 해리되어 유리 이온을 형성하는 염을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전해질은 리튬, 나트륨, 칼륨, 루비듐, 세슘, 마그네슘, 칼슘, 스트론튬, 바륨, 암모늄, 포스포늄, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 양이온을 갖는 염을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전해질은 세페이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 포스페이트, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 음이온을 갖는 염을 포함할 수 있다. 전해질은 황산나트륨, 염화나트륨, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0201] 전해질은 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)와 같은 다양한 공급원으로부터 다양한 등급으로 시판될 수 있으며, 이 중 많은 것은 본원에서 개시된 방법에 의해 부탄올을 제조하거나 회수하는 추출성 발효에서 사용하기에 적합할 수 있다. 전해질은 발효 배지를 추출용매와 접촉시키거나 또는 침전, 결정화 및/또는 증발과 같은 다른 물리적 또는 화학적 방법에 의해 형성되는 수성상으로부터, 또는 발효 배지로부터 당업계에 알려진 방법에 의해 회수될 수 있다. 회수된 전해질은 후속한 발효에서 사용될 수 있다.

[0202] 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄을 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 발효 배지 내의 농도를 달성하는데 필요한 전해질의 양은 예를 들어 본원 하기의 실시예의 절차에 의해 개시된 바와 같이 측정될 수 있다. 분배 계수에 대해 긍정적인 효과를 갖는 전해질 농도의 범위는 예를 들어 실험에 의해 측정된다. 흥미있는 미생물과 허용가능한 생물융화성을 나타내는 전해질 농도의 범위가 또한 측정된다. 다음, 적합한 전해질 농도의 범위는 이들 2개의 범위의 중복으로부터 선택되어, 부탄을 분배 계수에 대해 긍정적인 효과를 갖는데 필요한 전해질의 양은 미생물과 허용가능한 수준의 생물융화성을 제공하는 농도 범위와 균형을 이룬다. 경제적인 고려사항이 또한, 사용될 삼투물질의 양을 선택하는 요소일 수 있다.

[0203] 한 실시 양태에서, 전해질은 미생물과 생물융화성인, 즉 미생물에 대해 비독성이거나, 또는 미생물이 허용가능한 수준으로 손상될 범위로만 독성인 농도로 발효 배지 내에 존재할 수 있어서, 미생물은 계속해서 전해질의 존재 하에 부탄을 제조물을 발효 배지 내로 제조한다. 전해질의 생물융화성의 범위는 본원 하기의 실시예 2에서 기재된 바와 같이 다양한 농도의 전해질의 존재 하에 미생물의 성장 속도에 의해 측정될 수 있다. 생물융화성의 전해질 농도는 미생물이 포도당(또는 다른 탄소원)을 이용하게 하거나 또는 성장하게 하는 한편, 비-생물융화성의 전해질 농도는 예를 들어 과량의 전해질이 존재하지 않을 때, 성장 속도의 약 25% 초과의 속도로는 성장하지 않게 하거나 포도당(또는 다른 탄소원)을 이용하지 못하게 한다. 발효 제조물, 예를 들어 부탄올의 존재는 또한, 미생물과 생물융화성을 갖는 전해질의 농도 범위에 영향을 미칠 수 있다. 생물융화성을 갖는 농도 범위 내에서 전해질을 사용하는 것은, 미생물을 포함하는 발효 배지를 전해질과 접촉시킨 후에 부탄올이 계속해서 제조되는 것이 필요한 과정에 바람직하다. 미생물을 포함하는 발효 배지를 전해질과 접촉시킨 후에 부탄올이

계속해서 제조되는 것이 필요하지 않는 과정에서는, 전해질은 미생물과의 생물융화성을 만약 있다고 해도 거의 갖지 않는 농도 범위에서 사용될 수 있다.

[0204] 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄을 분배 계수에 비해 부탄을 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 전해질의 발효 배지 내에서의 농도를 달성하기 위해서, 전해질은 발효 배지에, 또는 미생물의 성장기 동안에, 부탄을 농도가 억제성일 때 부탄을 제조기 동안에 2상 발효 배지의 수성상에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다. 전해질은 제1 추출용매에, 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다. 전해질은 고체로서, 슬러리로서, 또는 수용액으로서 첨가될 수 있다. 임의로, 전해질은 발효 배지 및 추출용매(들) 둘다에 첨가될 수 있다. 전해질은 연속, 준-연속, 또는 배치 방식으로 첨가될 수 있다. 전해질은, 그것이 도입되는 전체 스트림에, 예를 들어 발효기 내 전체 발효 배지에, 또는 하나 이상의 용기로부터 취해지는 부분 스트림에, 예를 들어 발효기로부터 취해지는 부분 스트림에 첨가될 수 있다.

[0205] 실시 양태에서, 발효 배지 내 전해질의 총 농도는 약 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M, 0.8M, 또는 1M 초과이다. 일부 실시 양태에서, 발효에서 전해질의 농도는 약 1M 미만이고, 일부 실시 양태에서, 발효에서 전해질의 농도는 약 2M 미만이다.

[0206] 발효

[0207] 미생물은 적합한 발효기 내에서 적합한 발효 배지 내에서 배양되어서 부탄을 제조할 수 있다. 교반 탱크 발효기, 에어리프트(airlift) 발효기, 버블 발효기, 또는 그의 임의의 조합을 비롯하여 임의의 적합한 발효기가 사용될 수 있다. 미생물 배양의 유지 및 성장을 위한 물질 및 방법은 미생물 또는 발효 과학의 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Bailey et al., Biochemical Engineering Fundamentals, second edition, McGraw Hill, New York, 1986]을 참조). 미생물, 발효, 및 과정의 특정 요건에 따라, 적절한 발효 배지, pH, 온도, 및 호기성, 미세호기성, 또는 협기성 조건에 대한 필요 사항을 고려해야 한다. 사용되는 발효 배지는 중요하지 않지만, 사용되는 미생물의 성장을 지지하고 목적하는 부탄을 제조물을 제조하는데 필요한 생합성 경로를 촉진 시켜야 한다. 효모 추출물 또는 웨튼과 같은 유기 질소원 및 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 함유하는 복합 배지; 최소 배지; 및 한정 배지가 포함되나 이에 제한되지 않는 통상의 발효 배지가 사용될 수 있다. 적합한 발효가능한 탄소원에는 포도당 또는 과당과 같은 단당류; 젖당 또는 설탕과 같은 이당류; 올리고당류; 전분 또는 셀룰로스와 같은 다당류; 하나의 탄소 기질; 및 그의 혼합물이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 적절한 탄소원 외에도, 발효 배지는 적합한 질소원, 예컨대 암모늄 염, 효모 추출물 또는 웨튼, 미네랄, 염, 보조인자, 완충제 및 당업자에게 알려진 기타 성분을 함유할 수 있다(상기 베일리(Bailey) 등). 추출성 발효를 위한 적합한 조건은 사용되는 특정 미생물에 좌우하고, 일상적인 실험을 사용해 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다.

[0208] 첨가되는 전해질과 함께 추출성 발효를 사용하여 부탄을 회수하는 방법

[0209] 부탄을은 부탄을, 물, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄을 분배 계수에 비해 부탄을 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도의 전해질, 임의로 적어도 하나의 발효가능한 탄소원, 및 유전자 변형된(즉, 유전자 조작된) 미생물을 함유하는 발효 배지로부터 회수되어, 적어도 하나의 탄소원으로부터 생합성 경로를 통해 부탄을을 제조할 수 있다. 그러한 유전자 변형 미생물은 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 및 효모로부터 선택될 수 있고, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이, 락토바실러스 플란타룸, 및 사카로마이세스 세레비시에를 포함한다. 과정 중의 한 단계는 발효 배지를 제1 불수용성 유기 추출용매 및 임의로 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜, 수성상 및 부탄을-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 것이다. "접촉시킨다"는 것은, 발효 배지 및 유기 추출용매 또는 그의 용매 성분을 발효 과정 동안에 어느 때고 물리적으로 접촉시킨다는 것을 의미한다. 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다. 한 실시 양태에서, 발효 배지는 추가로 에탄올을 포함하고, 부탄을-함유 유기상은 에탄올을 함유할 수 있다.

[0210] 제1 추출용매 및 제2 추출용매가 사용될 때, 접촉은 이미 조합되었던 제1 추출용매 및 제2 추출용매와 함께 수행될 수 있다. 예를 들어, 제1 추출용매 및 제2 추출용매는 혼합 탱크와 같은 용기 내에서 조합될 수 있고, 그런 다음, 조합된 추출용매는 발효 배지가 든 용기에 첨가될 수 있다. 대안적으로, 접촉은 제1 추출용매 및 제2 추출용매와 함께 수행될 수 있는데, 접촉 동안에 이들 용매들이 조합되게 된다. 예를 들어, 제1 추출용매 및 제2 추출용매는 발효 배지가 든 용기에 따로 첨가될 수 있다. 한 실시 양태에서, 발효 배지를 유기 추출용매와 접촉시키는 것은, 발효 배지 및 제1 추출용매를 제2 추출용매와 접촉시키기 전에, 발효 배지를 제1 추출용매와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 한 실시 양태에서, 제2 추출용매와의 접촉은 제1 추출용매와의 접촉과 동일한 용기 내에서 일어날 수 있다. 한 실시 양태에서, 제2 추출용매와의 접촉은 제1 추출용매와의 접촉과 상이한

용기 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 제1 추출용매는 하나의 용기 내에서 발효 배지와 접촉될 수 있고, 내용물은 제2 추출용매와의 접촉이 일어나는 또다른 용기로 옮겨질 수 있다. 이들 실시 양태에서, 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다.

[0211] 유기 추출용매는 2상 발효 배지를 형성하는 발효의 시작 시에 발효 배지와 접촉될 수 있다. 대안적으로, 유기 추출용매는, 배양물의 광학 밀도를 측정함으로써 결정될 수 있는 목적하는 양의 성장을 미생물이 달성한 후에 발효 배지와 접촉될 수 있다. 한 실시 양태에서, 제1 추출용매는 하나의 용기 내에서 발효 배지와 접촉될 수 있고, 제2 추출용매는 동일한 용기 내의 발효 배지 및 제1 추출용매와 접촉될 수 있다. 또다른 실시 양태에서, 제2 추출용매는 상이한 용기 내에서 발효 배지 및 제1 추출용매와 접촉될 수 있으며, 이 용기에서 제1 추출용매는 발효 배지와 접촉한다. 이들 실시 양태에서, 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다.

[0212] 추가로, 유기 추출용매는, 발효 배지 내의 부탄을 수준이 이미 선택된 수준에 도달할 때에, 예를 들어 부탄을 농도가 독성 수준 또는 억제성 수준에 도달하기 전에, 발효 배지와 접촉할 수 있다. 부탄을 농도는 기체 크로마토그래피 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같이 당업계에 알려진 방법을 사용해 발효 동안에 모니터링될 수 있다. 전해질은 부탄을 농도가 독성 수준 또는 억제성 수준에 도달하기 전 또는 후에 발효 배지에 첨가될 수 있다. 실시 양태에서, 유기 추출용매는 지방산을 포함한다. 실시 양태에서, 본원에서 기재된 과정은 미국 특허 출원 제61/368429호 및 제61/379546호에서 기재된 과정과 함께 사용될 수 있으며, 여기서 부탄을은 리파아제와 같은 촉매를 사용해 지방산과 같은 유기산을 이용해 에스테르화되어 부탄을 에스테르를 형성한다.

[0213] 발효는 광학 밀도 측정에 의해 결정되는 바와 같이, 미리 선택된 수준의 성장을 달성하기에 충분한 배양 시간 동안 호기성 조건 하에서 진행될 수 있다. 전해질은 미리 선택된 수준의 성장이 달성되기 전 또는 후에 발효 브로쓰에 첨가될 수 있다. 다음, 미국 특허 출원 제12/478,389호의 실시예 6에서 상세히 기재된 바와 같이, 인듀서(inducer)가 첨가되어, 변형된 미생물에서의 부탄을 생합성 경로의 발현을 유도할 수 있고, 발효 조건은 미세호기성이나 협기성 조건으로 전환되어 부탄을 제조를 자극한다. 추출용매는 미세호기성이나 협기성 조건으로 전환된 후에 첨가될 수 있다. 전해질은 미세호기성이나 협기성 조건으로 전환되기 전이나 후에 첨가될 수 있다. 한 실시 양태에서, 제1 추출용매는, 발효 배지 및 제1 추출용매가 제2 추출용매와 접촉되기 전에, 발효 배지와 접촉될 수 있다. 예를 들어, 배치 발효 과정에서, 발효 배지가 제1 및 제2 추출용매와 접촉되는 사이에 적합한 기간이 경과되도록(elapse) 허용될 수 있다. 연속 발효 과정에서, 발효 배지가 제1 추출용매와 접촉되는 것은 하나의 용기 내에서 일어날 수 있고, 용기의 내용물이 제2 추출용매와 접촉되는 것은 제2 용기 내에서 일어날 수 있다. 이들 실시 양태에서, 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다.

[0214] 전해질의 존재 하에 발효 배지를 유기 추출용매와 접촉시킨 후, 부탄을 제조물은 유기 추출용매 내로 분배되어서, 미생물을 함유하는 수성상 내에서의 농도를 감소시켜서, 제조 미생물이 억제성 부탄을 제조물에 노출되는 것을 제한한다. 사용되는 유기 추출용매의 부피는 하기 기재된 바와 같이, 발효 배지의 부피, 발효기의 크기, 부탄을 제조물용 추출용매의 분배 계수, 전해질 농도, 및 선택되는 발효 방식을 비롯한 많은 요소에 좌우된다. 유기 추출용매의 부피는 발효기 작동 부피의 약 3% 내지 약 60%일 수 있다. 추출용매 대 발효 배지의 비는 부피:부피 기준으로 약 1:20 내지 약 20:1, 예를 들어 약 1:15 내지 약 15:1, 또는 약 1:12 내지 약 12:1, 또는 약 1:10 내지 약 10:1, 또는 약 1:9 내지 약 9:1, 또는 약 1:8 내지 약 8:1이다.

[0215] 첨가되는 전해질의 양은 부탄을 제조 미생물의 성장 특성에 미치는 첨가되는 전해질의 효과, 및 2-상 발효에서 부탄을의 Kp에 미치는 첨가되는 전해질의 효과를 비롯한 많은 요소에 좌우된다. 첨가되는 전해질의 최적량은 초기 기본 발효 배지의 조성에 좌우될 수 있다. 전해질의 농도가 너무 높으면, 부탄을의 Kp를 증가시키고 미생물에 미치는 부탄을의 독성 효과를 완화시키는 것이 가능하더라도, 그 자체가 미생물에 억제성일 수 있다. 다른 한편으로는, 전해질의 농도가 너무 낮으면, 부탄을의 Kp를 증가시키지 않아서 미생물에 미치는 부탄을의 억제성 효과를 충분히 완화시킬 것이다. 따라서, 과량의 전해질을 발효 배지에 첨가하는 순수한 효과가 부탄을 제조의 속도 및 적정 농도를 전반적으로 증가시키는 것을 확인하기 위해 실험을 통해 균형이 발견될 필요가 있다. 또한, 당업자는 삼투물질(들)을 내인성적으로 제조하기 위해 미생물을 유전자 변형시킴으로써, 또는 배지에 외인성적으로 내삼투물질(osmoprotectant) 또는 삼투물질을 첨가함으로써, 미생물에 대한 염의 생물융화성을 조정할 수 있었다. 실시 양태에서, Kp는 전해질이 첨가되지 않은 Kp와 비교해 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 약 150%, 또는 약 200%만큼 증가된다. 실시 양태에서, Kp는 적어도 약 2-배, 적어도 약 3-배, 적어도 약 4-배, 적어도 약 5-배, 또는 적어도 약 6-배만큼 증가된다. 실시 양태에서, 전해질의 총 농도는, 전해질이 첨가되지 않을 경우의 성장 속도의 적어도 약 25%, 적어도

약 50%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%인 수준에서 미생물의 성장 속도를 유지하는 양만큼 K_p 를 증가시키도록 선택된다. 실시 양태에서, 발효 배지 내 전해질의 총 농도는, 전해질이 첨가되지 않을 때의 속도와 비교해 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%만큼 부탄을 제조의 유효 속도를 증가시키기에 충분하다. 실시 양태에서, 발효 배지 내 전해질의 총 농도는, 전해질이 첨가되지 않을 때의 유효 수율과 비교해 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%만큼 부탄을의 유효 수율을 증가시키기에 충분하다. 실시 양태에서, 발효 배지 내 전해질의 총 농도는, 전해질이 첨가되지 않을 때의 유효 적정 농도와 비교해 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100%만큼 부탄을의 유효 적정 농도를 증가시키기에 충분하다.

[0216]

실시 양태에서, 첨가되는 전해질의 양은 적어도 약 7g/L, 적어도 약 10g/L, 적어도 약 15g/L, 적어도 약 20g/L, 적어도 약 25g/L, 적어도 약 30g/L, 또는 적어도 약 40g/L의 유효 적정 농도를 초래하기에 충분하다. 실시 양태에서, 첨가되는 전해질의 양은 적어도 약 0.12, 적어도 약 0.15, 적어도 약 0.2, 적어도 약 0.25, 또는 적어도 약 0.3의 유효 수율을 초래하기에 충분하다. 실시 양태에서, 첨가되는 전해질의 양은 적어도 약 0.1g/L/h, 적어도 약 0.15g/L/h, 적어도 약 0.2g/L/h, 적어도 약 0.3g/L/h, 적어도 약 0.4g/L/h, 적어도 약 0.6g/L/h, 적어도 약 0.8g/L/h, 적어도 약 1g/L/h, 또는 적어도 약 1.2g/L/h의 유효 속도를 초래하기에 충분하다. 일부 실시 양태에서, 유효 속도는 약 1.3g/L/h이다.

[0217]

다음 단계는 사이포닝(siphoning), 경사분리(decantation), 중력 침강기(gravity settler)를 사용하는 원심분리, 막-보조 상 분리가 포함되나 이에 제한되지 않는, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 부탄을-함유 유기상을 수성상으로부터 임의로 분리하는 것이다.

[0218]

부탄을-함유 유기상으로부터 부탄을을 회수하는 것은 증류, 수지에 의한 흡착, 분자 망(molecular sieve)에 의한 분리, 및 투과증발이 포함되나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 사용해 수행될 수 있다. 구체적으로는, 증류는 부탄을-함유 유기상으로부터 부탄을을 회수하는데 사용될 수 있다. 추출용매는 부탄을 제조 및/또는 회수 과정으로 재활용될 수 있다.

[0219]

전해질은 당업계에 공지된 방법에 의해 발효 배지로부터, 또는 2-상 혼합물의 수성상으로부터 회수될 수 있다. 예를 들어, 수성상 또는 발효 배지는 증류, 스트라이핑, 투과증발, 또는 다른 방법에 의해 농축되어, 전해질을 포함하는 농축된 수성 혼합물을 수득할 수 있다. 임의로, 전해질은 발효 배지로 되돌려져서, 발효 과정 내에서 재활용될 수 있다. 임의로, 발효 배지로부터 수득되는 전해질은 발효 배지에 첨가되어, 기본 발효 배지의 염농도의 존재 하에서의 부탄을 분배 계수에 비해 부탄을 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도를 제공할 수 있다.

[0220]

기체 스트라이핑은 전해질의 첨가 및 유기 추출용매와 동시에 사용되어서, 발효 배지로부터 부탄을 제조물을 제거할 수 있다. 기체 스트라이핑은 공기, 질소 또는 이산화탄소와 같은 기체를 발효 배지에 통과시킴으로써 수행되어, 부탄을-함유 기체상을 형성할 수 있다. 부탄을 제조물은 부탄을을 농축시키기 위해 냉수 트랩(chilled water trap)을 사용하거나 또는 기체상을 용매로 문지르는 것과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용해 부탄을-함유 기체상으로부터 회수될 수 있다.

[0221]

발효 진행이 완료된 후에 발효 배지에 남아 있는 임의의 부탄을은 신선한 또는 재활용된 유기 추출용매를 사용한 계획되는 추출에 의해 회수될 수 있다. 대안적으로, 부탄을은 증류, 공비 증류, 액체-액체 추출, 흡착, 기체 스트라이핑, 막 증발, 투과증발 등과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용해 발효 배지로부터 회수될 수 있다. 발효 배지가 과정에 재활용되지 않는 경우에, 추가의 전해질이 첨가되어 부탄을 분배 계수를 추가로 증가시키고 부탄을 회수의 효율을 개선시킬 수 있다.

[0222]

2-상 추출성 발효 방법은 교반된 탱크 발효기에서 연속 방식으로 수행될 수 있다. 이 방식에서, 발효 배지 및 부탄을-함유 유기 추출용매의 혼합물은 발효기로부터 제거된다. 2개의 상은 상기 기재된 바와 같이 사이포닝, 경사분리, 중력 침강기를 사용한 원심분리, 막-보조 상 분리 등이 포함되나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 수단에 의해 분리된다. 분리 후, 발효 배지 및 그 안에 있는 전해질은 발효기로 재활용될 수 있거나, 신선한 배지로 대체될 수 있고, 여기에 추가의 전해질이 첨가된다. 다음, 추출용매는 상기 기재된 바와 같이 부탄을 제조물을 회수하도록 처리된다. 다음, 추출용매는 제조물의 추가의 추출을 위해 발효기로 다시 재활용될 수 있다. 대안적으로, 신선한 추출용매는 계속해서 발효기에 첨가되어 제거된 추출용매를 대체할 수 있다. 이러한 연속 방식의 작동은 여러 이점을 제공한다. 제조물이 계속해서 반응기로부터 제거되기 때문에, 더 큰 부피

의 발효 배지가 사용될 수 있게 하려면 더 작은 부피의 유기 추출용매가 필요하다. 이로써 제조 수율이 더 높아진다. 유기 추출용매의 부피는 발효기 작업 부피의 약 3% 내지 약 50%; 발효기 작업 부피의 약 3% 내지 약 20%; 또는 발효기 작업 부피의 약 3% 내지 약 10%일 수 있다. 가능한 한 발효기 내에서 가장 적은 양의 추출용매를 사용하여 수성상의 부피를 최대화시키고 따라서 발효기 내의 세포의 양을 최대화시키는 것이 유리하다. 과정은, 추출용매가 발효기 및 분리 장치 사이에서 계속해서 재활용되고 발효 배지가 계속해서 발효기로부터 제거되고 신선한 배지로 다시 보충되는, 전체적으로 연속 방식으로 작동될 수 있다. 이러한 전체적으로 연속 방식에서, 부탄을 제조물은 임계 독성 농도에 도달하도록 허용되지 않고, 신선한 영양분이 계속해서 제공되어 발효가 장기간의 시간 동안 수행될 수 있다. 이들 방식의 2-상 추출성 발효를 수행하는데 사용될 수 있는 장치는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제4,865,973호에서 콜레업(Kollerup) 등에 의해 기재된다.

[0223] 배치식 발효 방식이 또한 사용될 수 있다. 당업계에 잘 알려진 배치 발효는, 발효 배지의 조성이 발효의 시작 시에 설정되고 과정 동안에 인위적인 변경을 받지 않는 폐쇄적인 시스템이다. 이러한 방식으로, 바람직한 양의 보충 전해질 및 유기 추출용매의 부피가 발효기에 첨가되고, 추출용매는 과정 동안에 제거되지 않는다. 유기 추출용매는 제1 추출용매 및 임의의 제2 추출용매를 따로 첨가하여 발효기에서 형성될 수 있거나, 또는 발효기에 임의의 추출용매를 첨가하기 전에 제1 추출용매 및 제2 추출용매가 조합되어 추출용매를 형성할 수 있다. 전해질은 발효 배지에, 제1 추출용매에, 임의의 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다. 이러한 발효 방식은 상기 기재된 연속 또는 전체적으로 연속 방식보다 더 간편하더라도, 발효 배지 내의 억제성 부탄을 제조물의 농도를 최소화시키기 위해서는 더 큰 부피의 유기 추출용매가 필요하다. 결과적으로, 발효 배지의 부피는 더 적고, 제조되는 제조물의 양은 연속 방식을 사용하여 수득되는 것보다 더 적다. 배치식 방식에서의 유기 추출용매의 부피는 발효기 작업 부피의 20% 내지 약 60%; 또는 발효기 작업 부피의 30% 내지 약 60%일 수 있다. 상기 기재된 이유로 인해, 가능한 한 최소 부피의 추출용매를 발효기에서 사용하는 것이 유리하다.

[0224] 페드-배치(fed-batch) 발효 방식이 또한 사용될 수 있다. 페드-배치 발효는 표준 배치 시스템의 변이(variation)이고, 이 안에 영양분, 예를 들어 포도당이 발효 동안에 증분으로 첨가될 수 있다. 영양분의 첨가 속도 및 양은 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 발효 배지 내의 임계 양분 농도는 발효 동안에 모니터링될 수 있다. 대안적으로, pH, 용존 산소, 및 이산화탄소와 같은 폐가스의 분압과 같이 더욱 쉽게 측정되는 요소가 모니터링될 수 있다. 이들 측정되는 파라미터로부터, 영양분 첨가 속도는 측정될 수 있다. 사용되는 유기 추출용매의 양 및 이러한 방식으로 그것을 첨가하는 방법은 상기 기재된 배치식 방식으로 사용되는 것과 동일하다. 첨가되는 전해질의 양은 다른 발효 방식에서와 동일할 수 있다.

[0225] 제조물의 추출은 본래 자리에서보다는 발효기의 다운스트림에서 수행될 수 있다. 이러한 외부(external) 방식에서, 부탄을 제조물을 유기 추출용매 내로 추출하는 것은 발효기로부터 제거되는 발효 배지 상에서 수행된다. 전해질은 발효기로부터 제거되는 발효 배지에 첨가될 수 있다. 사용되는 추출용매의 양은 발효기 작업 부피의 약 20% 내지 약 60%; 또는 발효기 작업 부피의 약 30% 내지 약 60%이다. 발효 배지는 발효기로부터 계속해서 또는 주기적으로 제거될 수 있고, 유기 추출용매에 의한 부탄을 제조물의 추출은 발효 배지로부터 세포를 제거하면서 또는 제거하는 것 없이 수행될 수 있다. 세포는 여과 또는 원심분리가 포함되나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 수단에 의해 발효 배지로부터 제거될 수 있다. 전해질은 세포 제거 전에 또는 후에 발효 배지에 첨가될 수 있다. 상기 기재된 수단에 의해 추출용매로부터 발효 배지를 분리한 후, 발효 배지는 발효기 내로 재활용되거나, 버려지거나, 또는 임의의 남아 있는 부탄을 제조물의 제거를 위해 처리될 수 있다. 유사하게는, 단리된 세포가 또한 발효기로 재활용될 수 있다. 부탄을 제조물을 회수하기 위한 처리 후에, 추출용매는 추출 과정에서 사용되기 위해 재활용될 수 있다. 대안적으로, 신선한 추출용매가 사용될 수 있다. 이 방식에서, 추출용매는 발효기 내에 존재하지 않아서, 추출용매의 독성이 문제가 되는 것이 훨씬 덜하다. 추출용매와 접촉되기 전에 세포가 발효 배지로부터 분리된다면, 추출용매 독성의 문제는 추가로 감소될 수 있다. 더욱이, 이러한 외부 방식을 사용해, 예멸전이 형성될 기회가 거의 없고 추출용매의 증발이 최소화되어 환경적 염려를 완화시킨다.

첨가되는 전해질과 함께 추출성 발효를 사용하여 부탄을 제조하는 방법

[0226] 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 생합성 경로를 통해 부탄을 제조하도록 유전적으로 변형된 미생물이 수성상, 및 i) 제1 불수용성 유기 추출용매 및 임의로 ii) 제2 불수용성 유기 추출용매를 포함하는 2상 발효 배지 내에서 성장되고, 2상 발효 배지는 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄을 분배 계수에 의해 부탄을 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 적어도 하나의 전해질을 추가로 포함하는, 개선된 부탄을 제조 방법이 제공된다. 그러한 유전자 변형 미생물은 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 및 효

모로부터 선택될 수 있고, 예를 들어 에스케리키아 콜라이, 락토바실러스 플란타룸, 및 사카로마이세스 세레비시애를 포함한다. 제1 불수용성 유기 추출용매는 C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알코올, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산의 에스테르, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알데하이드, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 임의의 제2 불수용성 유기 추출용매는 C₇ 내지 C₂₂ 알코올, C₇ 내지 C₂₂ 카르복실산, C₇ 내지 C₂₂ 카르복실산의 에스테르, C₇ 내지 C₂₂ 알데하이드, C₇ 내지 C₂₂ 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 여기서 2상 발효 배지는 약 10부피% 내지 약 90부피%의 유기 추출용매를 포함한다. 대안적으로, 2상 발효 배지는 약 3부피% 내지 약 60부피%, 또는 약 15부피% 내지 약 50부피%의 유기 추출용매를 포함한다. 미생물은 부탄올을 추출용매 내로 추출하기에 충분한 시간 동안 2상 발효 배지 내에서 성장되어, 부탄올-함유 유기상을 형성한다. 발효 배지 내 전해질의 적어도 충분한 농도는 미생물의 성장기 동안에 전해질을 수성상에, 부탄올 제조기 동안에 수성상에, 수성상 내 부탄올 농도가 억제성일 때 수성상에, 제1 추출용매에, 제2 추출용매에, 또는 그의 조합에 첨가함으로써 달성될 수 있다.

[0228] 한 실시 양태에서, 발효 배지는 추가로 에탄올을 포함하고, 부탄올-함유 유기상은 에탄올을 함유할 수 있다. 다음, 부탄올-함유 유기상은 상기 기재된 바와 같이 수성상으로부터 분리된다. 이어서, 부탄올은 상기 기재된 바와 같이 부탄올-함유 유기상으로부터 회수된다.

[0229] 적어도 하나의 탄소원으로부터 생합성 경로를 통해 부탄올을 제조하도록 유전적으로 변형된 미생물이 발효 배지 내에서 성장되고, 미생물은 부탄올을 발효 배지 내로 제조하여 부탄올-함유 발효 배지를 제조하는, 개선된 부탄올 제조 방법이 또한 제공된다. 그러한 유전자 변형 미생물은 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 및 효모로부터 선택될 수 있고, 예를 들어 에스케리키아 콜라이, 락토바실러스 플란타룸, 및 사카로마이세스 세레비시애를 포함한다. 적어도 하나의 전해질은 발효 배지에 첨가되어, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 전해질을 제공한다. 한 실시 양태에서, 전해질은 미생물 성장기가 느려질 때 발효 배지에 첨가될 수 있다. 한 실시 양태에서, 전해질은 부탄올 제조기가 완료될 때 발효 배지에 첨가될 수 있다. 부탄올-함유 발효 배지 중 적어도 일부는 C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알코올, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산의 에스테르, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 알데하이드, C₁₂ 내지 C₂₂ 지방산 아미드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) C₇ 내지 C₂₂ 알코올, C₇ 내지 C₂₂ 카르복실산, C₇ 내지 C₂₂ 카르복실산의 에스테르, C₇ 내지 C₂₂ 알데하이드, C₇ 내지 C₂₂ 지방산 아미드 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉되어, 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성한다. 다음, 부탄올-함유 유기상은 상기 기재된 바와 같이 수성상으로부터 분리된다. 이어서, 부탄올은 상기 기재된 바와 같이 부탄올-함유 유기상으로부터 회수된다. 수성상 중 적어도 일부는 발효 배지로 되돌려진다. 한 실시 양태에서, 발효 배지는 추가로 에탄올을 포함하고, 부탄올-함유 유기상은 에탄올을 함유할 수 있다.

[0230] 아이소부탄올은 미국 특허 출원 제12/478,389호에서 개시된 바와 같이, 유기 추출용매로서 올레일 알코올과 함께, 변형된 에스케리키아 콜라이 균주를 사용하는 추출성 발효에 의해 제조될 수 있다. 이 방법은 통상의 발효 기술을 사용하는 것과 비교해 더 높은 유효 적정 농도(즉, 37g/L)의 아이소부탄올을 제공한다(미국 특허 출원 제12/478,389호의 실시예 6을 참조). 예를 들어, 아츠미(Atsumi) 등(문헌[Nature 451(3):86-90, 2008])은, 아이소부탄올 생합성 경로를 함유하도록 유전적으로 변형된 에스케리키아 콜라이를 이용한 발효를 사용해 22g/L 이하의 아이소부탄올 적정 농도를 보고한다. 적어도 부분적으로는 발효 배지로부터 독성 부탄올 제조물이 제거됨으로써 미생물에 독성인 것보다 더 낮은 수준으로 유지되어 미국 특허 출원 제12/478,389호에서 개시된 추출성 발효 방법으로 수득되는 부탄올 적정 농도가 더 높아진다. 본원에서 정의된 바와 같이 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 발효 배지 내의 농도로 적어도 하나의 전해질의 사용을 적용하는 본 발명의 추출성 발효 방법이 유사한 방식으로 사용되고 유사한 결과를 제공할 것이라고 가정하는 것이 합당하다.

[0231] 본원에서 개시된 방법에 의해 제조되는 부탄올은 발효 배지의 리터 당 22g 초과의 유효 적정 농도를 가질 수 있다. 대안적으로, 개시된 방법에 의해 제조되는 부탄올은 발효 배지의 리터 당 적어도 25g의 유효 적정 농도를 가질 수 있다. 대안적으로, 본원에서 개시된 방법에 의해 제조되는 부탄올은 발효 배지의 리터 당 적어도 30g의 유효 적정 농도를 가질 수 있다. 대안적으로, 본원에서 개시된 방법에 의해 제조되는 부탄올은 발효 배지의 리터 당 적어도 37g의 유효 적정 농도를 가질 수 있다.

[0232] 본 발명의 방법은 일반적으로 도 1 내지 도 7을 참조로 하여 하기에서 기재된다.

[0233] 이제 도 1을 참조로 하여, 본래 자리에서의 추출성 발효를 사용하여 부탄올을 제조하고 회수하는 과정에 대한 하나의 실시 양태의 개략도가 제시된다. 임의로 전해질을 함유하는 적어도 하나의 발효가능한 탄소원의 수성 스트림(10)은, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 제조하는 적어도 하나의 유전자 변형 미생물(제시되지 않음)을 함유하는 발효기(20)에 도입된다. 임의로, 전해질은 별도의 스트림(제시되지 않음)으로서 발효기에 첨가될 수 있다. 제1 추출용매의 스트림(12) 및 임의의 제2 추출용매의 스트림(14)은 용기(16)에 도입되고, 이 안에서 제1 추출용매 및 제2 추출용매는 조합되어서 조합된 추출용매(18)를 형성한다. 임의로, 전해질은 스트림(18)에, 용기(16)에, 제1 추출용매의 스트림(12)에, 제2 추출용매의 스트림(14)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 추출용매의 스트림(18)은 발효기(20)에 도입되고, 이 안에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시켜서 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 것이 발생된다. 수성상 및 유기상 둘다를 포함하는 스트림(26)은 용기(38)에 도입되고, 이 안에서 수성상 및 유기상의 분리가 수행되어 부탄올-함유 유기상(40) 및 수성상(42)을 제조한다. 임의로, 전해질을 함유하는 수성상(42) 중 적어도 일부는 발효기(20) 또는 또다른 발효기(제시되지 않음)로 되돌려진다(제시되지 않음). 전해질을 과정에 첨가하는 포인트(들)는, 수성상(42) 내의 전해질의 농도가 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 선택된다.

[0234] 이제 도2를 참조로 하여, 본래 자리에서의 추출성 발효를 사용하여 부탄올을 제조하고 회수하는 과정에 대한 하나의 실시 양태의 개략도가 제시된다. 임의로 전해질을 함유하는 적어도 하나의 발효가능한 탄소원의 수성 스트림(10)은, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 제조하는 적어도 하나의 유전자 변형 미생물(제시되지 않음)을 함유하는 발효기(20)에 도입된다. 임의로, 전해질은 별도의 스트림(제시되지 않음)으로서 발효기에 첨가될 수 있다. 제1 추출용매의 스트림(12) 및 임의의 제2 추출용매의 스트림(14)은 발효기(20)에 따로 도입되고, 이 안에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시켜서 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 것이 발생된다. 임의로, 전해질은 스트림(12)에, 스트림(14)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 수성상 및 유기상 둘다를 포함하는 스트림(26)은 용기(38)에 도입되고, 이 안에서 수성상 및 유기상의 분리가 수행되어 부탄올-함유 유기상(40) 및 수성상(42)을 제조한다. 임의로, 전해질을 함유하는 수성상(42) 중 적어도 일부는 발효기(20) 또는 또다른 발효기(제시되지 않음)로 되돌려진다(제시되지 않음). 전해질을 과정에 첨가하는 포인트(들)는, 수성상(42) 내의 전해질의 농도가 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 선택된다.

[0235] 이제 도 3을 참조로 하여, 본래 자리에서의 추출성 발효를 사용하여 부탄올을 제조하고 회수하는 과정에 대한 하나의 실시 양태의 개략도가 제시된다. 임의로 전해질을 함유하는 적어도 하나의 발효가능한 탄소원의 수성 스트림(10)은, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 제조하는 적어도 하나의 유전자 변형 미생물(제시되지 않음)을 함유하는 제1 발효기(20)에 도입된다. 임의로, 전해질은 별도의 스트림(제시되지 않음)으로서 발효기에 첨가될 수 있다. 제1 추출용매의 스트림(12)은 발효기(20)에 도입되고, 제1 추출용매 및 발효기(20)의 내용물의 혼합물을 포함하는 스트림(22)은 제2 발효기(24)에 도입된다. 임의의 제2 추출용매의 스트림(14)은 제2 발효기(24)에 도입되고, 이 안에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시켜서 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 것이 발생된다. 임의로, 전해질은 스트림(12)에, 스트림(22)에, 스트림(14)에, 용기(24)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 수성상 및 유기상 둘다를 포함하는 스트림(26)은 용기(38)에 도입되고, 이 안에서 수성상 및 유기상의 분리가 수행되어 부탄올-함유 유기상(40) 및 수성상(42)을 제조한다. 임의로, 전해질을 함유하는 수성상(42) 중 적어도 일부는 발효기(20) 또는 또다른 발효기(제시되지 않음)로 되돌려진다(제시되지 않음). 전해질을 과정에 첨가하는 포인트(들)는, 수성상(42) 내의 전해질의 농도가 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 선택된다.

[0236] 이제 도 4를 참조로 하여, 본래 자리에서 보다는 발효기의 다운스트림에서 제조물의 추출이 수행되는, 부탄올을 제조하고 회수하는 과정에 대한 하나의 실시 양태의 개략도가 제시된다. 임의로 전해질을 함유하는 적어도 하나의 발효가능한 탄소원의 수성 스트림(110)은, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 제조하는 적어도 하나의 유전자 변형 미생물(제시되지 않음)을 함유하는 발효기(120)에 도입된다. 임의로, 전해질은 별도의 스트림(제시되지 않음)으로서 발효기에 첨가될 수 있다. 제1 추출용매의 스트림(112) 및 임의의 제2 추출용매의 스트림(114)은 용기(116)에 도입되고, 이 안에서 제1 추출용매 및 제2 추출용매는 조합되어서 조합된 추출용매(118)를 형성한다. 스트림(122)으로서 제시되는, 발효기(120) 내의 발효 배지 중 적

어도 일부는 용기(124)에 도입된다. 임의로, 전해질은 스트림(112)에, 스트림(114)에, 스트림(118)에, 용기(124)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 추출용매의 스트림(118)은 또한 용기(124)에 도입되고, 이 안에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시켜서 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 것이 발생된다. 수성상 및 유기상 둘다를 포함하는 스트림(126)은 용기(138)에 도입되고, 이 안에서 수성상 및 유기상의 분리가 수행되어 부탄올-함유 유기상(140) 및 수성상(142)을 제조한다. 전해질을 함유하는 수성상(142) 중 적어도 일부는 발효기(120)에, 또는 임의로 또다른 발효기(제시되지 않음)로 되돌려진다. 전해질을 과정에 첨가하는 포인트(들)는, 수성상(142) 내의 전해질의 농도가 기본 발효 배지의 염농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 선택된다.

[0237] 이제 도 5를 참조로 하여, 본래 자리에서 보다는 발효기의 다운스트림에서 제조물의 추출이 수행되는, 부탄올을 제조하고 회수하는 과정에 대한 하나의 실시 양태의 개략도가 제시된다. 임의로 전해질을 함유하는 적어도 하나의 발효가능한 탄소원의 수성 스트림(110)은, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 제조하는 적어도 하나의 유전자 변형 미생물(제시되지 않음)을 함유하는 발효기(120)에 도입된다. 임의로, 전해질은 별도의 스트림(제시되지 않음)으로서 발효기에 첨가될 수 있다. 제1 추출용매의 스트림(112) 및 제2 추출용매의 스트림(114)은 따로 용기(124)에 도입되고, 이 안에서 제1 추출용매 및 제2 추출용매는 조합되어서 조합된 추출용매를 형성한다. 임의로, 전해질은 스트림(112)에, 스트림(114)에, 스트림(122)에, 용기(124)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 스트림(122)으로서 제시되는, 발효기(120) 내의 발효 배지 중 적어도 일부가 또한, 용기(124) 내로 도입되고, 이 안에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시켜서 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 함유하는 2-상 혼합물을 형성되는 것이 발생한다. 수성상 및 유기상 둘다를 포함하는 스트림(126)은 용기(138)에 도입되고, 이 안에서 수성상 및 유기상의 분리가 수행되어 부탄올-함유 유기상(140) 및 수성상(142)을 제조한다. 전해질을 함유하는 수성상(142) 중 적어도 일부는 발효기(120)에, 또는 임의로 또다른 발효기(제시되지 않음)로 되돌려진다. 전해질을 과정에 첨가하는 포인트(들)는, 수성상(142) 내의 전해질의 농도가 기본 발효 배지의 염농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 선택된다.

[0238] 이제 도 6을 참조로 하여, 본래 자리에서 보다는 발효기의 다운스트림에서 제조물의 추출이 수행되는, 부탄올을 제조하고 회수하는 과정에 대한 하나의 실시 양태의 개략도가 제시된다. 임의로 전해질을 함유하는 적어도 하나의 발효가능한 탄소원의 수성 스트림(110)은, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원을 포함하는 발효 배지로부터 부탄올을 제조하는 적어도 하나의 유전자 변형 미생물(제시되지 않음)을 함유하는 발효기(120)에 도입된다. 임의로, 전해질은 별도의 스트림(제시되지 않음)으로서 발효기에 첨가될 수 있다. 제1 추출용매의 스트림(112)은 용기(128)에 도입되고, 스트림(122)으로서 제시되는, 발효기(120) 내의 발효 배지 중 적어도 일부가 또한 용기(128)에 도입된다. 임의로, 전해질은 스트림(122)에, 스트림(112)에, 용기(128)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 제1 추출용매 및 발효기(120)의 내용물의 혼합물을 포함하는 스트림(130)은 제2 용기(132) 내로 도입된다. 임의로, 전해질은 스트림(130)에, 스트림(114)에, 용기(132)에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 임의의 제2 추출용매의 스트림(114)은 제2 용기(132)에 도입되고, 이 안에서 발효 배지를 추출용매와 접촉시켜서 수성상 및 부탄올-함유 유기상을 포함하는 2-상 혼합물을 형성하는 것이 발생된다. 수성상 및 유기상 둘다를 포함하는 스트림(134)은 용기(138)에 도입되고, 이 안에서 수성상 및 유기상의 분리가 수행되어 부탄올-함유 유기상(140) 및 수성상(142)을 제조한다. 전해질을 함유하는 수성상(142) 중 적어도 일부는 발효기(120)에, 또는 임의로 또다른 발효기(제시되지 않음)로 되돌려진다. 전해질을 과정에 첨가하는 포인트(들)는, 수성상(142) 내의 전해질의 농도가 기본 발효 배지의 염농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분하도록 선택된다.

[0239] 본원에서 기재된 추출 과정은 배치 과정으로서 진행될 수 있거나, 또는 신선한 추출용매가 첨가되고 사용된 추출용매는 펌핑으로 배출되어서 발효기 내의 추출용매의 양이 전체 발효 과정 동안에 여전히 일정하게 되는 연속 방식으로 진행될 수 있다. 발효 제조물 및 부산물의 그러한 연속적인 추출은 유효 속도, 적정 농도 및 수율을 증가시킬 수 있다.

[0240] 더욱 또다른 실시 양태에서, 또한, 일련의 배치 발효기가 사용될 때 배치 작동 프로파일의 차이를 설명하는 가요성 코-커런트(co-current) 또는 대안적으로는 리버스-커런트(counter-current) 방식으로 액체-액체 추출을 작동시키는 것이 가능하다. 이러한 시나리오에서, 플랜트(plant)가 작동되고 있는 한, 적어도 하나의 발효가능한 탄소원 및 미생물을 차례로 연속해서 제공하는 발효가능한 매쉬(mash)가 발효기에 채워진다. 도 7을 참조로 해서, 일단 발효기(F100)는 매쉬 및 미생물로 채워지고, 매쉬 및 미생물을 연속 루프에서 발효기(F101)로 진행된다. 도 8을 참조로 해서, 일단 발효기(F102)로 진행되고, 그런 다음 발효기(F100)로 다시 진행된다. 전해질은 하나 이상의 발효기에,

발효기에 들어가는 스트림에, 발효기로부터 빠져 나오는 스트림에, 또는 그의 조합에 첨가될 수 있다(제시되지 않음). 임의의 하나의 발효기 내에서 발효가 일단 시작되고, 매쉬 및 미생물은 함께 존재하고, 발효가 완료될 때까지 계속된다. 매쉬 및 미생물 충전 시간은 총 사이클 시간(채움, 발효, 비움(empty) 및 세정)을 발효기의 수로 나눈 것과 동일하다. 만약 총 사이클 시간이 60시간이고 3개의 발효기가 있다면, 충전 시간은 20시간이다. 만약 총 사이클 시간이 60시간이고 4개의 발효기가 있다면, 충전 시간은 15시간이다.

[0241] 어댑티브 코-커런트(adaptive co-current) 추출은, 더 높은 브로쓰 상(broth phase) 적정 농도에서 작동되는 발효기는 부탄을 농도에서 가장 풍부한 추출성 용매 스트림을 이용할 수 있고, 가장 낮은 브로쓰 상 적정 농도에서 작동되는 발효기는 부탄을 농도에서 가장 가느다란 추출성 용매 스트림으로부터 이득을 얻게 될 것이라고 가정하는 발효 프로파일을 따른다. 예를 들어, 다시 도 7을 참조로 해서, 발효기(F100)는 발효의 시작 지점에 있고 상대적으로 낮은 부탄을 브로쓰 상 (B) 적정 농도에서 작동하는 경우를 고려하면, 발효기(F101)는 상대적으로 온화한 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 발효의 중간에 있고, 발효기(F102)는 상대적으로 높은 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 발효의 종점(end) 근처에 있다. 이 경우, 추출된 부탄올이 최소로 있거나 전혀 없는 가느다란 추출성 용매(S)가 발효기(F100)에 공급될 수 있고, 추출된 부탄을 성분을 갖는 발효기(F100)로부터 "용매 방출(solvent out)" 스트림(S')은 그런 다음 "용매 유입(solvent in)" 스트림으로서 발효기(F101)에 공급될 수 있고, F101로부터의 용매 방출 스트림은 그런 다음 스트림 내에서 그의 용매로서 발효기(F102)에 공급될 수 있다. 그런 다음, F102로부터의 용매 방출 스트림은 가공되도록 보내어져서 스트림 내에 존재하는 부탄올을 회수할 수 있다. 부탄올의 대부분이 제거된 가공된 용매 스트림은 가느다란 추출성 용매로서 시스템에 되돌려질 수 있고, 상기 발효기(F100)에 공급되는 용매일 것이다.

[0242] 발효가 순서대로 가공됨에 따라, 추출성 용매 매니폴드(manifold) 내의 벨브는 가장 낮은 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 발효기에 가장 가느다란 추출성 용매를 공급하도록 재위치될 수 있다. 예를 들어, (a) 발효기(F102)가 그의 발효를 완료하고 다시 로딩되었고 발효가 새로 시작되며, (b) 발효기(F100)가 온화한 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 그의 발효의 중간에 있으며, 그리고 (c) 발효기(F101)가 상대적으로 더 높은 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 그의 발효의 종점 근처에 있는 것으로 가정한다. 이 시나리오에서, 가장 가느다란 추출성 용매는 F102에 공급될 것이고, F102를 떠나는 추출성 용매는 발효기(F100)에 공급될 것이고, 발효기(F100)를 떠나는 추출성 용매는 발효기(F101)에 공급될 것이다.

[0243] 이러한 방식으로 작동되는 이점은, 생산성의 개선을 현실화시키기 위해 가능한 한 오랫 동안 그리고 가능한 한 낮은 브로쓰 상 부탄을 적정 농도를 유지하는 것일 수 있다. 추가로, 더 높은 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에서 작동되는 발효 내로 추가로 가공되는 다른 발효기의 온도를 하락시키는 것이 가능할 수 있다. 온도의 하락은 더 높은 부탄을 브로쓰 상 적정 농도에 대한 개선된 내성을 허용할 수 있다.

본 발명의 방법의 이점

[0245] 본 추출 발효 방법은 가솔린의 에너지량과 유사한 에너지량을 가지는 것으로 알려져 있으며, 어느 화석 연료와도 블렌드될 수 있는 부탄올을 제공한다.

[0246] 부탄올은, 그것이 표준 내부 연소 엔진에서 연소되었을 때 단지 CO_2 를 제공하고 SO_x 나 NO_x 는 거의 제공하지 않거나 전혀 제공하지 않기 때문에 연료나 연료 첨가제로서 선호된다. 추가로, 부탄올은 지금까지 가장 바람직한 연료 첨가제인 에탄올보다 덜 부식성이다.

[0247] 생물연료 또는 연료 첨가제로서의 그의 유용성외에도, 본 발명의 방법에 따라 제조되는 부탄올은 출현하는 연료 전지 산업에서 수소 분포 문제에 영향을 미치는 잠재성을 갖고 있다. 연료 전지는 오늘날 수소 수송 및 분포와 연관된 안정성 염려에 의해 골치가 되고 있다. 부탄올은 그의 수소 함량이 쉽게 개선될 수 있고, 연료 전지나 비히클에 필요한 순도 면에서 기존의 가스 스테이션(gas station)을 통해 분포될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 방법은 식물 유래의 탄소원으로부터 부탄올을 제조하여, 부탄올 제조를 위한 표준 석유화학 과정과 연관된 부정적인 환경적 영향을 피한다.

[0248] 본 발명의 이점은, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도로 적어도 하나의 전해질을 첨가하지 않으면서 2-상 추출성 발효 과정에 의해 수득되는 부탄올의 역치 수준보다 유의하게 더 높고 더욱 경제적인 순수한 유효 속도, 적정 농도, 및 수율로 부탄올을 제조하는 가능성을 포함한다. 본 발명의 방법은 또한, 배치 발효로부터 목적하는 수준의 부탄올 제조를 달성하는데 필요한 신선한 또는 재활용되는 추출용매의 순수한 양을 감소시킬 수 있다.

[0249] 실시예

[0250] 본 발명은 추가로 하기 실시예에서 정의된다. 이를 실시예는 본 발명의 바람직한 실시 양태를 나타내면서도 단지 예시적으로만 주어지는 것을 이해해야 할 것이다. 상기 토의 및 이들 실시예로부터, 당업자는, 본 발명의 필수적인 특징을 확인할 수 있고, 그의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 본 발명의 다양한 변화 및 변형이 이루어져서 이를 다양한 용도 및 조건에 맞춰지게 할 수 있다.

[0251] 재료

[0252] 하기 물질을 실시예에서 사용하였다. 모든 시중적인 시약은 받은 대로 사용하였다.

[0253] 모든 용매를 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트 루이스(St. Louis, MO) 소재)로부터 수득하였고, 추가의 정제 없이 사용하였다. 사용된 올레일 알코올은 공업용 등급이었고, 이는 올레일 알코올(65%)과 고급 및 저급 지방산 알코올의 혼합물을 함유하였다. 아이소부탄올(순도 99.5%)을 시그마-알드리치로부터 수득하였고, 추가의 정제 없이 사용하였다. 황산나트륨(Na_2SO_4 , CAS 7757-82-6, 99% 초과의 순도)을 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 수득하였다. 염화나트륨(NaCl , CAS 7647-14-5, 공업용 등급)을 EMD 케미칼즈, 인코포레이티드(EMD Chemicals, Inc.)(미국 뉴저지주 갑스타운(Gibbstown, NJ))로부터 구매하였다.

[0254] 일반 방법

[0255] 미생물 세포 농도를 측정하기 위한 광학 밀도 판독을 서모 일렉트론 코포레이션 헬리オス 알파 분광광도계(Thermo Electron Corporation Helios Alpha spectrophotometer)를 사용해 수행하였다. 측정은 전형적으로 600nm의 파장을 사용해 수행하였다.

[0256] 배양 브로쓰 내의 포도당 농도를 2700 셀렉트 바이오케미스트리 어낼라이저(2700 Select Biochemistry Analyzer)(미국 오하이오주 엘로우 스프링스(Yellow Springs, OH) 소재의 YSI 라이프 사이언시즈(YSI Life Sciences))를 사용해 신속히 측정하였다. 1.8ml 에펜도르프 튜브에서 13,200rpm에서 2분 동안 실온에서 배양 브로쓰 샘플을 원심분리하였고, 수성 상청액을 포도당 농도에 대해 분석하였다. 어낼라이저는 발효기 샘플의 각각의 세트를 어세이하기 전에 공지된 포도당 표준물을 사용한 자가-보정을 수행하였고; 외부 표준물을 또한 주기적으로 어세이해서 배양 브로쓰 어세이의 인테그리티(integrity)를 확인하였다. 분석용 어낼라이저 규격은 하기와 같았다:

[0257] 샘플 크기: $15\mu\text{l}$

[0258] 블랙 프로브 케미스트리: 텍스트로스

[0259] 화이트 프로브 케미스트리: 텍스트로스

[0260] 수성상 내의 아이소부탄올 및 포도당 농도를, 바이오라드 아미넥스 HPX-87H(BioRad Aminex HPX-87H) 칼럼, 7.8 mm x 300mm(미국, 캘리포니아주 헤클스(Hercules, CA) 소재의 바이오-라드 레버러토리즈(Bio-Rad laboratories))를 적절한 가드(guard) 칼럼과 함께 사용하고, 0.01N 수성 황산, 아이소크래틱(isocratic)을 용리제로서 사용하여 HPLC(미국 마이애미주 밀포드(Milford, MA) 소재의 와터스 얼라이언스 모델(Waters Alliance Model), 또는 미국 캘리포니아주 산타 클라라(Santa Clara, CA) 소재의 알리전트 1200 시리즈(Agilent 1200 Series))에 의해 측정하였다. 샘플을 $0.2\ \mu\text{m}$ 원심분리 필터(나노셉 MF 개질된 나일론(Nanosep MF modified nylon))를 통해 HPLC 바이알 내로 통과시켰다. HPLC 진행 조건은 하기와 같았다:

[0261] 주입 부피: $10\ \mu\text{l}$

[0262] 유속: $0.60\text{ml}/\text{분}$

[0263] 진행 시간: 40 분

[0264] 칼럼 온도: 40°C

[0265] 검출기: 굴절률

[0266] 검출기 온도: 35°C

[0267] UV 검출: 210nm, 8nm 대역폭

[0268] 진행 후에, 샘플 내의 농도를 화합물의 각각에 대한 표준 곡선으로부터 측정하였다. 체류 시간은 아이소부탄올을

및 포도당에 대해 제각기 32.6분 및 9.1분이었다.

[0269] 유기 추출용매 상 내의 아이소부탄을 및 에탄올을 하기 기재된 바와 같은 기체 크로마토그래피(GC)를 사용해 측정하였다.

[0270] 하기 GC 방법을 사용하여, 유기상 내의 아이소부탄을 및 에탄올의 양을 측정하였다. GC 방법은 아질런트 테크놀로지스(미국, 캘리포니아주, 산타 클라라 소재)의 J&W 사이언티픽 DB-왁세트르 칼럼(J&W Scientific DB-WAXETR column)(50m x 0.32mm ID, 1μm 필름)을 이용하였다. 담체 기체는 일정 헤드 압력을 이용해 4ml/분의 유속에서의 헬륨이었고; 주입기 스플릿(injector split)은 250°C에서 1:5이었고; 오븐 온도는 5분 동안 40°C, 10°C/분으로 40°C에서 230°C로, 그리고 5분 동안 230°C였다. 불꽃 이온화 검출을 40ml/분 헬륨 구성 기체와 함께 250°C에서 사용하였다. 주입 전에, 배양 브로쓰 샘플을 원심분리하였다. 주입 부피는 1.0μl였다. 보정된 표준 곡선이 에탄올 및 아이소부탄을에 대해 발생하였다. 이를 조건 하에, 아이소부탄을 체류 시간은 9.9분이었고, 에탄올에 대한 체류 시간은 8.7분이었다.

[0271] pflB, frdB, ldhA, 및 adhE 유전자의 결실을 갖는 이. 콜라이 균주의 구축

[0272] 이. 콜라이 유래의 pflB, frdB, ldhA, 및 adhE 유전자를 결실시키는 적합한 방법이 본원에서 제공된다. 이. 콜라이 균주의 케이오 모음(Keio collection)(문헌[Baba et al., Mol. Syst. Biol., 2:1-11, 2006])을 8개의 녹아웃의 제조에 사용하였다. 케이오 모음(일본 소재의 내셔널 인스티튜트 어브 제네티克斯(National Institute of Genetics)에서 NBRP로부터 입수가능함)은 다센코 및 배너(Datsenko and Wanner)(문헌[Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., Proc Natl Acad Sci., U S A, 97: 6640-6645, 2000])의 방법에 의해 균주 이. 콜라이 BW25113에서 만들어진 단일 유전자 녹아웃의 라이브러리이다. 이 모음에서, 각각의 결실된 유전자를 F1p 재조합효소에 의해 제거가능하였던 FRT-플랭크된 카나마이신 마커로 대체하였다. 박테리오파지 P1 형질도입에 의해 케이오 공여자 균주로부터 수여자 균주로 녹아웃-카나마이신 마커를 이동시킴으로써 여러 개의 녹아웃을 갖고 있는 이. 콜라이 균주를 구축하였다. 녹아웃을 제조하기 위해 각각의 P1 형질도입 후, 카나마이신 마커를 F1p 재조합효소에 의해 제거하였다. 이 마커가 없는(markless) 균주는 다음의 P1 형질도입을 위한 새로운 수여자 균주로서 작용하였다. P1 형질도입에 의해서보다는 다센코와 배너(상기)의 방법을 사용해, 기재된 녹아웃 중 하나를 직접 균주에서 구축하였다.

[0273] 4KO 이. 콜라이 균주를, 3개의 케이오 균주로부터 제조된 P1 파지 파체물을 이용하는 P1_{vir} 형질도입에 의하여 케이오 균주 JW0886에서 구축하였다. 사용된 케이오 균주를 하기에 열거한다: 사용된 케이오 균주는 하기에 열거된다:

[0274] - JW0886: kan 마커를 pflB에 삽입한 것

[0275] - JW4114 : kan 마커를 frdB에 삽입한 것

[0276] - JW1375 : kan 마커를 ldhA에 삽입한 것

[0277] - JW1228 : kan 마커를 adhE에 삽입한 것

[0278] [불활성화된 유전자에 상응하는 서열은 pflB(서열 목록 번호: 71), frdB(서열 목록 번호: 73), ldhA(서열 목록 번호: 77), adhE(서열 목록 번호: 75)임].

[0279] 염색체로부터 FRT-플랭크된 카나마이신 마커를 제거하는 것은 카나마이신-내성 균주를 pCP20 앰피실린-내성 플라스미드(상기 케레파노브(Cherepanov), 및 바커나겔(Wackernagel))로 형질전환시킴으로써 수행하였다. 형질전환체를 100 μg/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트 상에 퍼서 발랐다. 플라스미드 pCP20은 λ_{PR} 프로모터의 조절 하에 효모 FLP 재조합효소를 갖고 있고, 이 프로모터로부터의 발현은 플라스미드 상에 존재하는 cI857 온도-민감성 억제제(repressor)에 의해 조절된다. pCP20의 복제 기원 또한 온도-민감성이다.

[0280] 염색체로부터 loxP-플랭크된 카나마이신 마커를 제거하는 것은 카나마이신-내성 균주를 박테리오파지 P1 Cre 재조합효소를 갖고 있는 pJW168 앰피실린-내성 플라스미드로 형질전환시킴으로서 수행하였다(문헌[Wild et al., Gene. 223:55-66, 1998]). Cre 재조합효소(상기 문헌[Hoess, R.H. & Abremski, K.])는 loxP 부위에서의 재조합을 통해 카나마이신 내성 유전자의 삭제를 매개한다. pJW168의 복제 기원은 온도-민감성 pSC101이다. 형질전환체를 100μg/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트 위에 퍼서 발랐다.

[0281] 균주 JW0886(ΔpflB::kan)을 플라스미드 pCP20으로 형질전환시켰고, 100μg/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트 상에 30°C에서 퍼서 발랐다. 다음, 앰피실린 내성 형질전환체를 선택하였고, LB 플레이트 상에서 스트레이킹

(streaking)을 하였고, 42°C에서 성장시켰다. 단리된 콜로니를 앰피실린 및 카나마이신 선별성 배지 플레이트 및 LB 플레이트 상에 패칭하였다. 프라이머 pf1B CkUp(서열 목록 번호: 78) 및 pf1B CkDn(서열 목록 번호: 79)을 이용한 콜로니 PCR에 의해 카나마이신-민감성 및 앰피실린-민감성 콜로니를 스크리닝하였다. PCR 반응 혼합물 중 10 μ l 분액을 젤 전기영동에 의해 분석하였다. 예상된 대략의 0.4kb PCR 제조물을 관찰하여, 마커가 제거된 것을 확인하고, "JW0886 마커-없는" 균주를 만들었다. 이 균주에는 pf1B 유전자가 결실되어 있다.

[0282] "JW0886 마커-없는" 균주를 JW4114 (frdB::kan) 유래의 P1_{vir} 과쇄물로 형질도입시켰고, 25 μ g/ml 카나마이신이 든 LB 플레이트 상에 스트레이킹하였다. 프라이머 frdB CkUp(서열 목록 번호: 80) 및 frdB CkDn(서열 목록 번호: 81)을 이용한 콜로니 PCR에 의해 카나마이신-내성 형질도입체를 스크리닝하였다. 예상되는 대략 1.6kb PCR 제조물을 제조하는 콜로니를 일렉트로컴피턴트(electrocompetent)하게 만들었고, 상기 기재된 바와 같이 마커 제거용 pCP20으로 형질전환시켰다. 형질전환체를 우선, 100 μ g/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트에 30°C에서 퍼서 발랐고, 다음, 앰피실린 내성 형질전환체를 선별하였고, LB 플레이트 상에 스트레이킹하였고, 42°C에서 성장시켰다. 단리된 콜로니를 앰피실린 및 카나마이신 선별성 배지 플레이트 및 LB 플레이트 상에 패칭하였다. 프라이머 frdB CkUp(서열 목록 번호: 80) 및 frdB CkDn(서열 목록 번호: 81)을 이용한 PCR에 의해 카나마이신-민감성, 앰피실린-민감성 콜로니를 스크리닝하였다. 예상되는 대략 0.4kb PCR 제조물을 관찰하였고, 이는 마커 제거를 확인해 주었고, 이중 녹아웃 균주인 " Δ pf1B frdB"를 만들었다.

[0283] 이중 녹아웃 균주를 JW1375 (Δ ldhA::kan)25 유래의 P1_{vir} 과쇄물로 형질도입시켰고, 25 μ g/ml 카나마이신이 든 LB 플레이트 상에 퍼서 발랐다. 프라이머 ldhA CkUp(서열 목록 번호: 82) 및 ldhA CkDn(서열 목록 번호: 83)을 이용한 콜로니 PCR에 의해 카나마이신-내성 형질도입체를 스크리닝하였다. 예상되는 1.5kb PCR 제조물을 제조하는 클론을 일렉트로컴피턴트하게 만들었고 상기 기재된 바와 같이 마커 제거용 pCP20으로 형질전환시켰다. 형질전환체를 100 μ g/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트에 30°C에서 퍼서 발랐고, 앰피실린 내성 형질전환체를 LB 플레이트 상에 스트레이킹하였고 42°C에서 성장시켰다. 단리된 콜로니를 앰피실린 및 카나마이신 선별성 배지 플레이트 및 LB 플레이트 상에 패칭하였다. 0.3kb 제조물에 대해 프라이머 ldhA CkUp(서열 목록 번호: 82) 및 ldhA CkDn(서열 목록 번호: 83)을 이용한 PCR에 의해 카나마이신-민감성, 앰피실린-민감성 콜로니를 스크리닝하였다. 예상되는 대략 0.3kb PCR 제조물을 제조하는 클론은 마커 제거를 확인시켜 주었고, 삼중 녹아웃 균주로 지정된 "3KO" (Δ pf1B frdB ldhA)를 만들었다.

[0284] "3KO" 균주를 JW1228 (Δ adhE::kan) 유래의 P1_{vir} 과쇄물로 형질도입시켰고, 25 μ g/ml 카나마이신이 든 LB 플레이트 상에 퍼서 발랐다. 프라이머 adhE CkUp(서열 목록 번호: 84) 및 adhE CkDn(서열 목록 번호: 85)을 이용한 콜로니 PCR에 의해 카나마이신-내성 형질도입체를 adhE 스크리닝하였다. 예상되는 1.6kb PCR 제조물을 제조하는 클론을 3KO adhE::kan으로 명명하였다. Δ 3KO adhE::kan 균주를 일렉트로컴피턴트하게 만들었고 마커 제거용 pCP20으로 형질전환시켰다. 형질전환체를 우선 100 μ g/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트에 30°C에서 퍼서 발랐고, 앰피실린 내성 형질전환체를 LB 플레이트 상에서 스트레이킹하였고 42°C에서 성장시켰다. 단리된 콜로니를 앰피실린 및 카나마이신 선별성 배지 플레이트 및 LB 플레이트 상에 패칭하였다. 프라이머 adhE CkUp(서열 목록 번호: 84) 및 adhE CkDn(서열 목록 번호: 85)을 이용한 PCR에 의해 카나마이신-민감성, 앰피실린-민감성 콜로니를 스크리닝하였다. 예상되는 대략 0.4kb PCR 제조물을 제조하는 클론을 "4KO" (Δ pf1B frdB ldhA adhE)라고 명명하였다.

[0285] 아이소부탄을 생합성 경로 및 pf1B, frdB, ldhA, 및 adhE 유전자의 결실을 함유하는 이. 콜라이 제조 숙주(균주 NGCI-031)의 구축

[0286] 아크로모박터 자일로속시단스 유래의 부탄을 탈수소효소인 sadB를 인코딩하는 DNA 단편(DNA 서열 목록 번호: 9; 단백질 서열 목록 번호: 10)을 표준 조건을 사용하여 A. 자일로속시단스 계놈 DNA로부터 증폭시켰다. 젠트라 퓨어진 키트(Gentra Puregene kit)(미국 미네소타주 미네아폴리스(Minneapolis, MN) 소재의 젠트라 시스템즈, 인코포레이티드(Gentra Systems, Inc.); 카탈로그 번호 D-5500A)를 사용하고, 그램 음성 유기체에 대해 권고된 프로토콜에 따라 DNA를 제조하였다. 제각기 퓨전 하이 피델리티 DNA 폴리머라아제(Phusion High Fidelity DNA polymerase)(미국 마이애미주 베버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스)와 함께 포워드(forward) 및 리버스(reverse) 프라이머 N473 및 N469(서열 목록 번호: 86 및 87)를 사용하여 PCR 증폭하였다. PCR 제조물을 pCR4 브런트(pCR4BLUNT)(인비트로겐(Invitrogen)) 내로 토포-블런트(TOPO-Blunt) 클로닝해서 pCR4Blunt::sadB를 제조하였고, 이를 이. 콜라이 매치-1(Mach-1) 세포 내로 형질전환시켰다. 이어서, 플라스미드를 4개의 클론으로부터 단리하였고, 서열을 확인하였다.

- [0287] 다음, *sadB* 코딩 영역을 벡터 pTrc99a 내로 클로닝하였다(문헌[Amann et al., Gene 69: 301-315, 1988]). pCR4Blunt::*sadB*를 EcoRI으로 분해하였고, *sadB* 단편을 방출시켰고, 이것을 EcoRI-분해된 pTrc99a와 연결해서 pTrc99a::*sadB*를 발생시켰다. 이 플라스미드를 이. 콜라이 마치 1 세포 내로 형질전환시켰고, 생성 형질전환체를 *Mach1*/pTrc99a::*sadB*라고 명명하였다. 이를 세포 내에서 *sadB* 유전자로부터 발현되는 효소의 활성은, 아이소부티르알데하이드를 표준물로서 사용해 분석했을 때 세포-없는 추출물 내에서 3.5mmol/분/mg 단백질인 것으로 측정되었다.
- [0288] 다음, 하기 기재된 바와 같이 *sadB* 유전자를 pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD* 내로 서브클로닝하였다. pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD*는 아이소부탄을 발현용 오페론을 갖고 있는 pTrc-99a 발현 벡터이다(미국 특허 출원 공보 제20070092957호의 실시예 9 내지 14에서 기재됨). pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD* 아이소부탄을 오페론 내의 제1 유전자는 클레브시엘라 뉴모니아 ATCC 25955 유래의 아세토락테이트 합성효소를 인코딩하는 *budB*이고, 이어서 이. 콜라이 유래의 아세토하이드록시산 환원이성질화효소를 인코딩하는 *ilvC* 유전자이다. 이것 다음에, 이. 콜라이 유래의 아세토하이드록시산 탈수효소를 인코딩하는 *ilvD*, 및 마지막으로 *L. 락티스* 유래의 분지쇄 케토산 탈카르복실화효소를 인코딩하는 *kivD* 유전자가 이어진다.
- [0289] 퓨전 하이 피델리티 DNA 폴리머라아제(미국 마이애미주 베버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스)와 함께 프라이머 N695A(서열 목록 번호: 88) 및 N696A(서열 목록 번호: 89)를 사용해 pTrc99a::*sadB*로부터 *sadB* 코딩 영역을 증폭시켰다. 98°C에서 1분 동안의 초기 변성, 및 이어서 98°C에서 10초 동안의 변성, 62°C에서 30초 동안의 어닐링, 72°C에서 20초 동안의 신장의 30 사이클, 및 72°C에서 5분 동안의 최종 신장 사이클, 및 이어서 4°C에서 유지시켜서 증폭을 수행하였다. 프라이머 N695A는 클로닝을 위한 *Avr II* 제한 부위, 및 *sadB* 코딩 영역의 ATG 개시 코돈의 RBS 업스트림을 함유하였다. N696A 프라이머는 클로닝용 *Xba I* 부위를 포함하였다. 1.1kb PCR 제조물을 *Avr II* 및 *Xba I*(미국 마이애미주 베버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스)로 분해하였고, 젤을 키아크 젤 추출 키트(Qiaquick Gel Extraction Kit)(미국 캘리포니아주 발렌시아(Valencia, CA) 소재의 키아젠 인코포레이티드(Qiagen Inc.))를 사용해 정제하였다. 정제된 단편을 T4 DNA 리가아제(미국 마이애미주 베버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스)를 사용해, 동일한 제한 효소를 사용해 절단되었던 pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD*와 함께 연결하였다. 연결 혼합물을 16 °C에서 밤새 인큐베이션시킨 다음, 제조업자의 프로토콜에 따라 이. 콜라이 마치(Mach) 1™ 컴파이턴트 세포(인비트로겐) 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 100µg/ml 앰피실린이 든 LB 아가(agar) 상에서 성장시킨 후 수득하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 키아프렙 스펀 미니프렙 키트(QIAprep Spin Miniprep Kit)(미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 키아젠 인코포레이티드)를 사용해 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 제조하였다. 생성 플라스미드를 pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD*-*sadB*라고 불렀다.
- [0290] 4KO 균주용 일렉트로컴파이턴트 세포를 기재된 바와 같이 제조하였고, pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD*-*sadB*("pBCDDB")를 사용해 형질전환시켰다. 형질전환체를 100µg/ml 앰피실린이 든 LB 아가 플레이트 상에 스트레이킹하였다. 4KO된 플라스미드 pTrc99A::*budB*-*ilvC*-*ilvD*-*kivD*-*sadB*를 갖고 있는 생성 균주(NGCI-031 균주로서 지정됨)를 지시된 실시예의 발효 연구에 사용하였다.
- [0291] 실시예 1
- [0292] 분배 계수(K_p)에 미치는 전해질 농도의 효과
- [0293] 본 실시예의 목적은, 올레일 알코올을 추출용매로서 사용했을 때 발효 배지 내의 전해질 농도가 아이소부탄의 분배 계수(K_p)에 미치는 효과를 평가하는 것이었다. 이. 콜라이 발효에 전형적으로 사용되는 기본 발효 배지(BFM)를 본 실시예에서 발효 배지로서 사용하였다. BFM 조성은 하기 표 2에서 제시된다.

[0294]

[豆 2]

BFM 조성

성분	농도 (g/L) 또는 지시된 대로	농도 (밀리몰/L; mM)
포타슘 포스페이트 일염기성 (monobasic)	13.3	97.73
암모늄 포스페이트 이염기성 (dibasic)	4.0	30.28
시트르산	1.7	8.09
모노하이드레이트		
마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트	2.0	8.11
미량 원소 (mM/L)	10.0	--
티아민	4.5	--
하이드록시로라이트 (mg/L)		
효모 추출물	5.0	--
시그마 소포제 204 (mM/L)	0.20	--
포도당	30.0	--

[0295]

[0296]

상기 배지에서 사용된 미량 원소 용액은 하기와 같이 제조하였다. 하기 열거된 성분을 열거된 순서대로 첨가하였고, 성분이 완전히 용해될 때까지 용액을 50°C 내지 60°C로 가열한다. 다른 성분이 용액 내에 있는 후에, 페리크(ferric) 시트레이트를 서서히 첨가하였다. 0.2마이크론 필터를 사용해 용액을 여과 멸균하였다.

EDTA 0.84 g/L
(에틸렌다이아민테트라아세트산)

코발트 다이클로라이드 혼사하이드레이트
(코발트 클로라이드 6-하이드레이트) 0.25g/L

망간 나이클로라이드 테트라하이드레이트
(망간 클로라이드 4-하이드레이트) 1.5g/L

쿠포릴(Cuprilic) 클로라이드 다이하이드레이트 0.15g/L

붕산 (H_3BO_3) 0.30 g/L

나트륨 볼리브레이트 다이하이드레이트 0.25g/L

아연 아세테이트 다이하이드레이트 1.30g/L

페 럭 시 트 레 이 트 10.0 g/L

[0297]

[0298]

표 2에서 제시된 바와 같이 BFM 내 총 염(포타슘 포스페이트 일염기성, 암모늄 포스페이트 이염기성, 시트르산 모노하이드레이트, 및 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트의 합)의 초기 수준은 약 144.2 mM인 것으로 계산된다. 이 콜라이 생물촉매를 하기 제시된 실시예에서 사용하였기 때문에, 0.31g/L(2mmole/L)에서 베타인 하이드로클로라이드(시그마-알드리치)를 기본 발효 배지에 첨가하였고, 이때문에 이 콜라이의 염 내성을 개선시키는 것이 문헌에 보고된다(문헌[Cosquer A, et al; 1999; Appl Environ Microbiol 65:3304-3311]).

[0299]

는 염화나트륨(NaCl)으로서 특정한 양의 전해질을 기본 발효 배지에 첨가하였다. 30mℓ의 전해질이 보충된 BFM에, 168g/L의 아이소부탄올을 함유하는 아이소부탄올 풍부한 올레일 알코올(OA) 추출용매 10mℓ를 첨가하였고, 30℃에서 약 4시간 내지 8시간 동안 테이블 탑 쉐이커(미국 뉴저지주 에디슨(Edison, NJ) 소재의 뉴 브런스윅 사이언티픽(New Brunswick scientific)의 이노바 4230(Innova 4230))에서 250RPM으로 쉐이킹하면서 격렬히 혼합하여, 2개의 상 사이에서 평형을 이루었다. 각각의 플라스크 내의 수성상 및 유기상을 경사분리에 의해 분리하였다. 수성상을 원심분리하여(에펜도르프 원심분리 모델 5415R을 이용해 13,000rpm에서 2분), 잔여 추출용매상을 제거하였고, 상청액을 포도당 및 아이소부탄올에 대해 HPLC에 의해 분석하였다. 4시간의 쉐이킹 후에 수성상 내의 아이소부탄올의 수준을 분석한 것은, 8시간의 혼합 후에 수득된 것과 유사하였고, 이는 2개의 상 사이의 평형이 4시간 내에 수득되었음을 제시하였다. 의도는, 4시간을 넘는 추가의 혼합이 K_p 를 변화시키지 않았음을 제시하는 것이었다.

[0300] 플라스크에 첨가된 아이소부탄올의 공지된 양, 및 수성상에 대해 측정된 아이소부탄올 농도 데이터로부터 유기상 및 수성상 사이의 아이소부탄올 분포에 대한 분배 계수(K_p)를 계산하였다. 추출용매 상 내의 아이소부탄올의 농도를 질량계(mass balance)에 의해 측정하였다. 유기상 및 수성상 내의 아이소부탄올 농도의 비로서 분배 계수를 측정하였는데, 즉, K_p 는 $[\text{아이소부탄올}]_{\text{유기상}} / [\text{아이소부탄올}]_{\text{수성상}}$ 이었다. 표 3 및 표 4에서 제시된 바와 같이 특정 수준의 전해질에 상응하는 각각의 데이터 포인트를 2회 반복하였고, K_p 값은 2개의 플라스크의 평균으로서 기록하였다.

[0301] [표 3]

아이소부탄올의 K_p 에 미치는 황산나트륨(Na_2SO_4)의 농도

BFM 내 염의 총 초기 농도 (표 2) 몰 / L (a)	BFM에 첨가되는 황산나트륨 Na_2SO_4 의 양 (몰 / L) (b)	실험에서 염의 총 양 몰 / L (a) + (b)	K_p
0.14	0.00	0.14	4.80
0.14	0.03	0.17	5.03
0.14	0.07	0.21	5.25
0.14	0.15	0.29	5.78
0.14	0.22	0.36	6.37
0.14	0.29	0.43	7.12
0.14	0.44	0.58	8.34
0.14	0.67	0.81	10.50
0.14	1.00	1.14	15.95
0.14	1.33	1.47	24.68
0.14	2.00	2.14	60.99

[0302]

[0303] [표 4]

아이소부탄올의 K_p 에 미치는 염화나트륨(NaCl) 농도의 효과

BFM 내 염의 총 초기 농도 (표 2) 몰 / L (a)	BFM에 첨가되는 염화나트륨 NaCl 의 양 (몰 / L) (b)	실험에서 염의 총 양 몰 / L (a) + (b)	K_p
0.14	0.00	0.14	4.87
0.14	0.01	0.15	4.87
0.14	0.04	0.18	4.89
0.14	0.07	0.21	4.95
0.14	0.11	0.25	5.00
0.14	0.14	0.28	5.00
0.14	0.21	0.35	5.22
0.14	0.33	0.47	5.04
0.14	0.67	0.81	5.91
0.14	1.00	1.14	6.88
0.14	1.33	1.47	8.06

[0304]

[0305] 표 3 및 4의 결과는, 수성 발효 배지에 전해질 Na_2SO_4 및 NaCl 을 보충하면 올레일 알코올이 추출용매 상으로서 있는 2개의 상 시스템에서 아이소부탄올에 대해 더 높은 K_p 를 초래하였음을 보여준다.

[0306] 실시예 2

[0307] 전해질 보충이 이.콜라이의 성장 속도에 미치는 효과

[0308] 생물촉매의 성장 특성에 미치는 Na_2SO_4 와 같은 전해질의 효과를 평가하기 위해, 이노바 테이블 탑 쉐이커(Innova table top shaker) 내, 30°C, 250RPM에서 쉐이크 플라스크 내에 0.31g/L의 베타인 하이드로클로라이드 및 상이한 수준의 Na_2SO_4 (0g/L 내지 284g/L)가 보충된 BFM 배지 내에서 4K0 이.콜라이 균주를 성장시켰다. 냉동된 바이알에서, 25mL의 종 배양물(seed culture)을, 30°C, 200RPM에서 BD 레버러토리즈(BD Laboratories)(미국, 매릴랜드주, 스팍스, 21152(Sparks, MD, 21152, USA) 소재의 벡턴 & 디킨슨 앤드 컴퍼니(Becton & Dickinson and Company))의 디프코 LB 브로쓰, 밀러 배지(Difco LB broth, Miller medium) 내에서 성장시켰다. 이러한 종 배양물 1mL을, 0.31g/L의 베타인 하이드로클로라이드 및 상이한 수준의 Na_2SO_4 가 보충된 30mL의 BFM 배지가 든 쉐이크 플라스크에 첨가하였다. 샘플을 정해진 시점에서 제거하여, OD₆₀₀에 의해 측정된 바와 같이 바이오매스(biomass) 성장을 모니터링하였다. 지수 성장 속도 방정식을 맞춤으로써(fitting) 바이오매스 시간 프로파일로부터 성장 속도를 계산하였다.

[0309] [표 5]

4K0 이.콜라이 균주의 성장 속도에 미치는 Na_2SO_4 의 효과			
BFM 내 염의 총 초기 농도 (표 2) (몰/L) (a)	BFM에 첨가되는 Na_2SO_4 의 농도 (몰/L) (b)	실 험에서 염의 총 양 몰/L (a) + (b)	이.콜라이 성장 속도 (μ) hr^{-1}
0.14	0.00	0.14	0.79
0.14	0.03	0.17	0.79
0.14	0.07	0.21	0.79
0.14	0.15	0.29	0.79
0.14	0.22	0.36	0.74
0.14	0.29	0.43	0.69
0.14	0.44	0.58	0.60
0.14	0.67	0.81	0.55
0.14	1.00	1.14	0.14
0.14	1.33	1.47	무시할 만한 성장
0.14	2.00	2.14	무시할 만한 성장

[0310]

[0311] 표 5에서 제시된 성장 속도 데이터는, 생물촉매는 전해질이 없는 대조군과 비교해 성장 속도가 30% 손실되었으며 약 0.67M Na_2SO_4 (0.81M의 총 염 수준)만큼 높은 염 수준을 관용할 수 있음을 제시한다. 그러나, 1M 염 농도에서 성장 속도가 유의하게 하락한다(약 80% 초과). 표 3의 데이터는, 0.67M 농도의 Na_2SO_4 에서, 부탄올에 대한 K_p 가 올레일-알코올이 추출용매 상으로서 존재할 때 염 첨가가 없는 대조군과 비교해 2배만큼 증가함을 제시한다. 그래서, 재조합 부탄올을 제조하는 미생물을 사용하는 2-상 추출성 발효에 전해질을 첨가하는 순수한 전체적인 효과는 예측할 수 없는데, 왜냐하면 전해질이 한편으로는 세포 성장을 억제시킬 수 있지만(표 3) 다른 한편으로는 독성 부탄올 제조물의 분배 계수를 증가시킬 수 있으며 이는 미생물에 미치는 그의 독성 효과를 완화시킬 수 있었다.

[0312] 실시예 3

[0313] 전해질 첨가가 2-상 추출성 발효 과정에서 부탄올 제조의 속도, 적정 농도, 및 수율에 미치는 효과

[0314] 본 실시예의 목적은, 아이소부탄을 생합성 경로를 함유하는 에스케리키아 콜라이(NGCI-031)의 균주인 재조합 미생물에 의해 부탄올이 제조되는 2-상 추출성 발효의 수성상에 적어도 충분한 양의 전해질을 첨가하는 이점을 언급하는 것이었다. 추출성 발효는 불수용성, 유기 추출용매로서 올레일 알코올을 사용한다.

[0315] 본원 상기의 일반적인 방법 섹션에서 기재된 바와 같이 에스케리키아 콜라이 균주 NGCI-031을 구축하였다. 선별 항생제로서 앰피실린(100mg/L)이 있는 류리아-베르타니(Luria-Bertani, LB) 배지에서 접종물 제조를 위한 모든 종 배양물을 성장시켰다. 사용된 발효 배지는 2mmole/L의 베타인 하이드로클로라이드가 보충된 준-합성 배지였고, 이의 조성은 하기 표6에서 주어진다.

[0316]

[표 6]

발효 배지 조성		
성분	양/L	양 (mmole/L)
인산 85%	0.75 ml	14.4
황산 (18M)	0.30 ml	5.60
발치의 w/ 코발트 (Balch's w/ Cobalt) - 1000X (은 10에 제공된 조성물)	1.00 ml	NA
포타슘 포스페이트 일염기성	1.40 g	10.30
시트르산 모노하이드레이트	2 g	9.50
마그네슘 살레이트, 헵타하이드레이트	2 g	8.10
페리암모늄 시트레이트	0.33 g	1.25
연화칼슘, 2수화물	0.20 g	1.36
효모 추출물 ^a	5.00 g	
소포제 204 ^b	0.20 ml	
베타인 하이드로클로라이드	0.32 g	
티아민스 (Thiaminse)·HCl, 5g/L 스톡 (stock)	1.00 ml	
앰피실린, 25 mg/ml 스톡	4.00 ml	
포도당 50% 증량% 스톡	33.3 ml	

^aBD 다이아그노스틱 시스템즈(BD Diagnostic Systems)(미국 메릴랜드주
스파스 소재)로부터 수득

^b시그마-알드리치로부터 수득

[0317]

[0318]

[표 7]

발치의 개질된 비량 금속 - 1000X	
성분	농도 (g/L)
시트르산 모노하이드레이트	40.0
MnSO ₄ ·H ₂ O	30.0
NaCl	10.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1
봉산 (H ₃ BO ₃)	0.1
소듐 불리브네이트 (NaMoO ₄ ·2H ₂ O)	0.1

[0319]

[0320]

표 6의 성분 1 내지 11을 쳐방된 농도로 물에 첨가하여, 발효기 내에서 0.4L의 최종 부피로 만들었다. 발효기의 내용물을 오토클레이브하여 멸균시켰다. 오토클레이브된 배지를 냉각시킨 후, 성분 12 내지 14를 혼합하였고, 여과 멸균시켰고, 발효기에 첨가하였다. 50ml의 종 접종물(seed inoculum)을 첨가한 후에 발효 배지(수성상)의 총 최종 부피는 약 0.5L였다.

[0321]

멸균 전에, Na₂SO₄ 형태의 전해질을 0g/L, 40g/L 또는 60g/L 농도로 배지에 첨가하였다. 앰피실린, 티아민 하이드로클로라이드, 및 포도당의 여과 멸균된 용액을, 멸균 후에 제각기 100mg/L, 5mg/L 및 20g/L의 최종 농도가 되게 발효기 배지에 첨가하였다. 작업 부피가 900ml인 1L 오토클레이브 가능한 생물반응기인 바이오 콘솔 ADI 1025(Bio Console ADI 1025)(미국 홀랜드주(Holland) 소재의 애플리콘, 인코포레이티드(Applikon, Inc))를 사용해 발효를 진행시켰다. 전체 발효 동안에 온도를 30°C에서 유지시켰고, 수산화암모늄을 사용해 pH를 6.8에서 유지시켰다. 멸균된 발효 배지를 종 배양물(2부피% 내지 10부피%)과 함께 접종한 후에, 진탕 속도(rpm)를 자동으로 조절함으로써 0.3vvm의 공기 유동을 갖는 30% 용존 산소(DO) 설정점에서 발효기를 공비 작동시켰다. 일단 목적하는 광학 밀도(OD₆₀₀)에 도달하면(즉, OD₆₀₀이 10이 되면), 0.4mM 내지 0.5mM 아이소프로필 베타-D-1 티오갈

락토피라노사이드를 첨가하여 배양물이 아이소부탄을 생합성 경로를 과발현하도록 유도하였다. 4시간의 유도 후, 공기 유동을 0.13s1pm으로 감소시키고 DO 설정점을 3% 내지 5%로 설정함으로써, 발효 조건을 미세호기성 조건으로 전환시켰다. 미세호기성 조건으로 전환되면, 아이소부탄을 제조를 개시하였고, 한편으로는 바이오매스 제조물로 되는 탄소의 양을 최소화시켜서, 아이소부탄을 제조물로부터 바이오매스 형성을 언커플링(uncoupling)하였다. 아이소부탄을 제조기 동안에 올레일 알코올(약 250mL)을 첨가하여, 수성상 내 아이소부탄을의 구성으로 인한 억제 문제를 완화시켰다. 포도당을 필요한 대로 한번에(as a bolus)(50중량% 원료 용액) 발효기에 첨가하여, 포도당 수준을 20g/L 내지 2g/L로 유지시켰다.

[0322] 생합성 경로에서 산화환원 균형을 이를 수 있게 하기 위해서는 아이소부탄을의 효율적인 제조가 미세호기성 조건을 필요로 하기 때문에, 0.3vvm에서 공기를 계속해서 발효기에 공급하였다. 계속적인 에어레이션(aeration)은 발효기의 수성상으로부터 아이소부탄을을 유의하게 스트라이핑하였다. 스트라이핑으로 인한 아이소부탄을의 손실을 정량하기 위해, 발효기로부터의 오프가스(off-gas)를 바로 질량 분광계(미국 위스콘신주 매디슨(Madison, WI) 소재 서모 일렉트론 코포레이션(Thermo Electron Corp.)의 프리마 dB 질량 분광계(Prima dB mass spectrometer))에 보내서, 기체 스트림 내의 아이소부탄을의 양을 정량하였다. 74 또는 42의 질량 대 충전비에서 아이소부탄을 피크를 계속해서 모니터링하여, 기체 스트림 내의 아이소부탄을의 양을 정량하였다.

[0323] 아이소부탄을 제조에 대해, 스트라이핑으로 인해 소실된 아이소부탄을에 대해 모두 보정된 유효 적정 농도, 유효 속도, 및 유효 수율을 표 형태로 하기에서 제시한다(표 8). 본원 상기에서 기재된 HPLC 방법을 사용해 수성상 내 아이소부탄을을 측정하였다. 본원 상기에서 기재된 GC 방법을 사용해 올레일-알코올 추출용매 상 내의 아이소부탄을을 측정하였다. 본원 상기에서 기재된 바와 같이 HPLC 및 YSI를 사용해 포도당 수준을 모니터링하였다.

[0324] 표 8의 결과에서 볼 수 있듯이, 아이소부탄을 제조를 위한 추출성 발효에서 전해질을 사용하는 것은 염이 첨가되지 않는 경우와 비교해 유의하게 더 높은 유효 적정 농도, 유효 속도 및 유효 수율을 초래한다. 박테리아 숙주에 독성인 아이소부탄을 제조물을 계속해서 올레일 알코올 상으로 추출하고, 수성상 내에서의 그의 농도를 감소시켜서, 미생물에 미치는 그의 독성을 감소시킨다. 추가로, 염을 배지에 첨가할 때, 유효 속도, 유효 적정 농도, 및 유효 수율의 예상치 못한 개선이 관찰된다. 원칙적으로 염의 첨가는 부탄을을 제조하는 생물촉매의 대사에 유해한 효과를 가질 수 있었을 뿐만 아니라, 염 첨가 조절이 없는 경우와 비교해 부탄을의 Kp를 증가시킴으로써 부탄을의 억제 효과를 완화시킬 수 있었다. 본 발명자들의 2-상 추출성 시스템에 염을 첨가하는 순수한 효과는 부탄을의 증가된 제조 및 회수를 선호한다.

[0325] [표 8]

실시예 3의 부탄을 제조 속도, 적정 농도, 및 수율에 미치는 염의 효과.

표 6에서 발효 배지에 첨가되는 Na ₂ SO ₄ 농도 (몰/L)	실험에서 염의 총 양 (표 6 + Na ₂ SO ₄) 몰/L	실험에서 유효 속도 (g/L/hr)	유효 적정 농도 (g/L)	유효 수율 (g/g)	Kp [OA 상 내에서의 농도]/[AQ 상 내에서의 농도]
0	0.05	0.09	6	0.06	3.1
0.28	0.33	0.14	9	0.10	4.5
0.42	0.47	0.14	9.4	0.12	5.4

발효 배지 내 염의 초기 양(표 6)은 약 0.05몰/L였다.

[0326] [실시예 4]

[0327] [0328] 발효 동안에 부탄을을 기체 스트라이핑하는 것과 커플링된 부탄을 제조의 속도, 적정 농도 및 수율에 미치는 전해질 첨가의 효과

[0329] 올레일 알코올 추출용매의 첨가 없이 수성상 발효 동안에 부탄을 제조에 미치는 전해질 첨가의 효과를 평가하기 위해, 올레일-알코올을 발효기 중 어떤 발효기에도 첨가하지 않는 것을 제외하고는 실시예 3을 반복하였다. 본 실시예에서, 수성상으로부터 부탄을을 기체 스트라이핑하는 것은 발효기의 공기 분사(air sparging)로 인해 일 반적이었다. 오프가스로 스트라이핑된 부탄을의 양을 질량 분광계를 사용해 실시예 3에서와 같이 정량하였다. 스트라이핑으로 인해 소실된 부탄을에 대해 모두 보정된 유효 속도, 적정 농도 및 수율을 하기의 표 9에서 제시한다.

[0330]

[표 9]

실시 예 4를 위한 발효 동안에 부탄올을 기체 스트라이핑하는 것과 쿠플링된
부탄올 제조의 속도, 적정 농도, 및 수율에 미치는 염의 효과

표 6에서 발효 배지에 첨가되는 Na ₂ SO ₄ 농도 (몰/L)	실험에서 염의 총 양 (표 6 + Na ₂ SO ₄) 몰/L	유효 속도 (g/L/hr)	유효 적정 농도 (g/L)	유효 수율 (g/g)	스트라이핑으로 인해 소실되는 아이소부탄올의 "그램 (gram)"
0	0.05	0.08	6.0	0.11	2.55
0.28	0.33	0.16	10.6	0.17	4.25
0.42	0.47	0.17	10.9	0.14	5.01

[발효 배지 내 염의 초기 양(표 9)은 약 0.05 몰/L 있음]

[0331]

[0332]

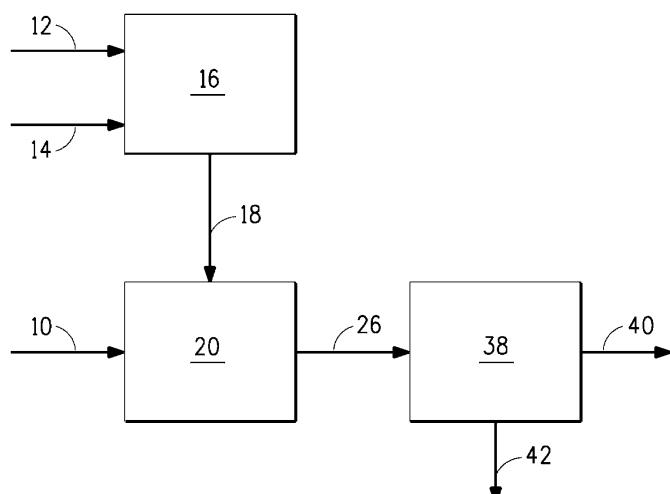
표 9의 결과는, 수성상에 전해질을 첨가하는 것은 아이소부탄올의 스트라이핑 속도를 증가시킴으로써 올레일 알코올의 부재 하에 부탄올 제조의 속도, 적정 농도 및 수율을 증가시키는 것을 제시한다. 스트라이핑된 부탄올의 그램(g)은 전해질을 첨가하지 않는 경우와 비교해 염의 존재 하에 거의 2배 더 높다.

[0333]

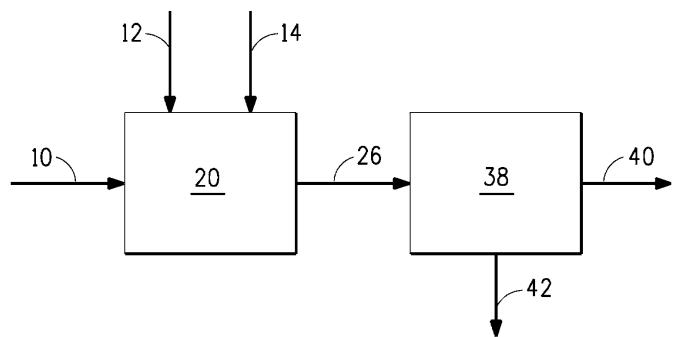
본 발명의 특정 실시 양태가 전술한 상세한 설명에서 기재되었지만, 당업자는 본 발명의 취지나 필수 부분(attribute)을 벗어나지 않으면서 본 발명이 많은 변형, 치환 및 재배열을 받을 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 취지를 나타내는 바와 같이, 전술한 명세서보다는 첨부된 청구항을 참조해야 할 것이다.

도면

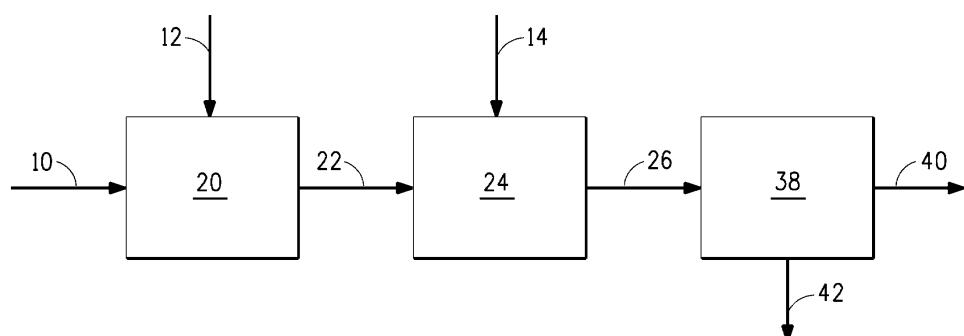
도면1



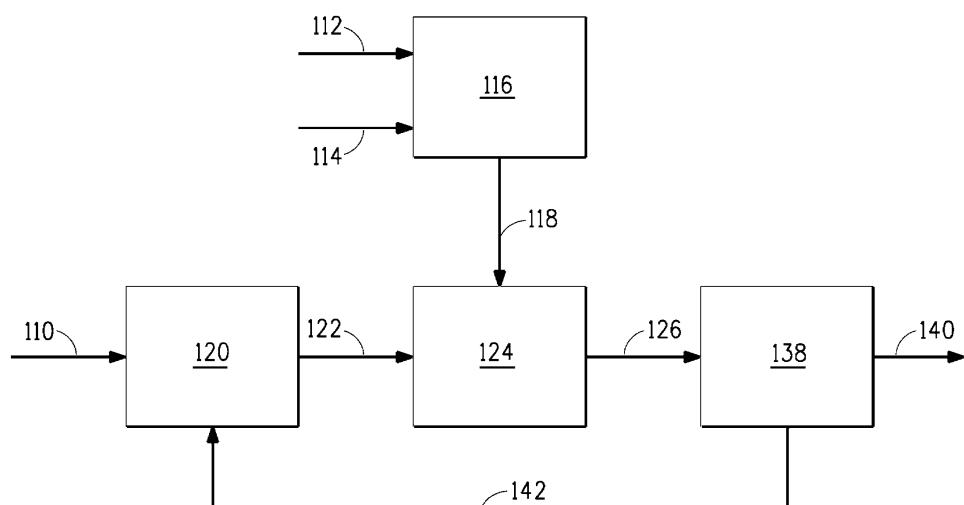
도면2



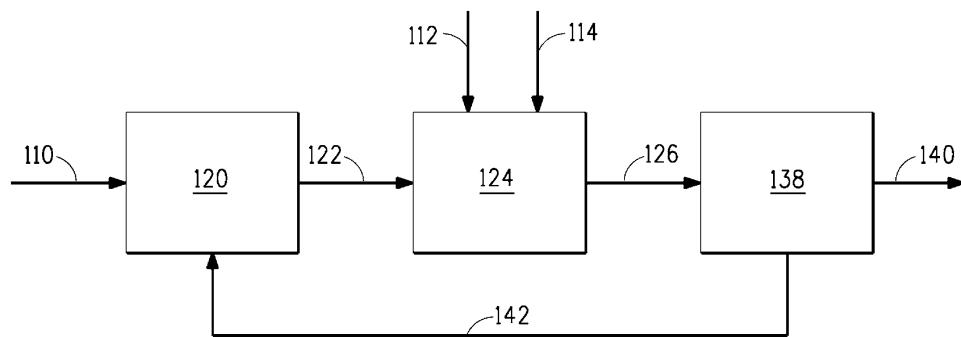
도면3



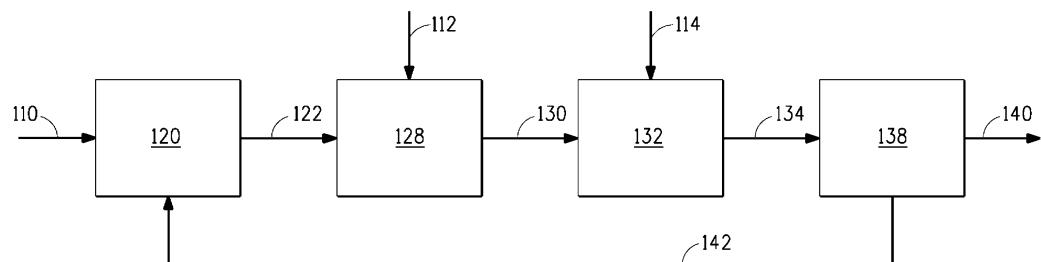
도면4



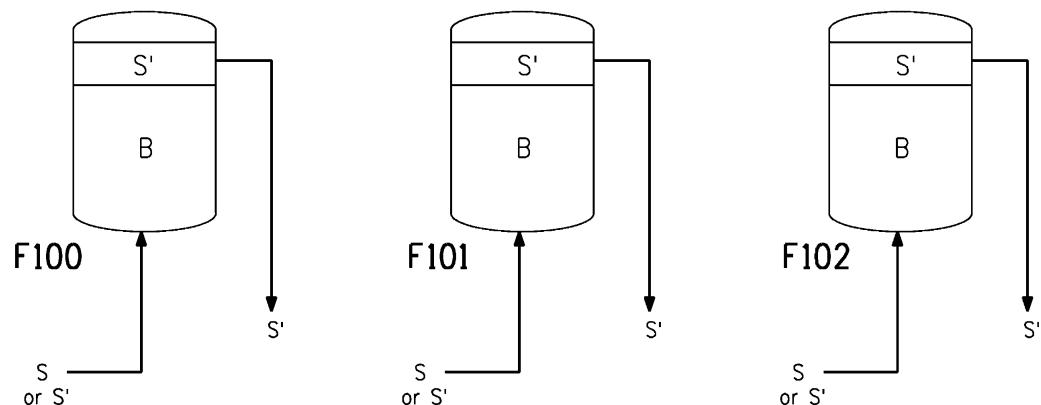
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Butamax (TM) Advanced Biofuels

<120> METHOD FOR PRODUCING BUTANOL USING EXTRACTIVE FERMENTATION WITH ELECTROLYTE ADDITION

<130> CL4574

<150> US 61/263,519

<151> 2009-11-23

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1680

<212> DNA

<213> Klebsiella pneumoniae

<400> 1

atggacaaac agtatccgt acgccagtgg ggcacggcg ccgatctgt cgtcagttag	60
ctggaagctc agggagtacg ccaggtttc ggcattcccg ggcacaaat cgacaaggc	120

tttatttcac tgctggattc ctccatcgat attattccgg tacgccacga agccaaagcc	180
gcatttatgg ccgcgcgcgt cggacgcatt accggcaag cggcgtaggc gctggtcacc	240
tccggtccgg gctgttccaa cctgatcacc ggcattggcca ccgcgaacag cgaaggcgac	300
ccggtggtgg ccctggcgcc cgccgtaaaa cgccgcgata aagcgaagca ggtccaccag	360
agtatggata cggtgccat gttcagcccg gtcaccaat acgcattcga ggtgacggcg	420
ccggatgcgc tggcgaagt ggtctccaaac gcctccgcg ccgcgcgata gggccggccg	480
ggcagcgcgt tcgttagct gcccaggat gtggtcgatg gcccggtag cggcaaaatg	540

ctgcccggcca gcccccccccc gcagatggc gcccgcgcg atgatgccat cgaccagggt	600
gcgaagctta tcgcccaggc gaagaacccg atttctgc tcggcctgtat ggccagccag	660
ccggaaaaca gcaaggcgct gcccgtttc ctggagacca gccatattcc agtaccaggc	720
acctatcagg cgcgcggagc ggtgaatcag gataacttct ctgcattcgc cggccgggtt	780
gggctgttta acaaccaggc cggggaccgt ctgctgcagc tcggcgcacct ggtgatctgc	840
atcgctaca gcccggtgga atacgaaccg gcgatgtgga acagcggcaa cgcgcacgt	900
gtgcacatcg acgtgctgcc cgcctatgaa gagcgcact acacccggta tgtcgagctg	960

gtggcgcata tcgcccgcac tctcaacaag ctggcgaaa atatcgatca tcggctggtg	1020
ctctcccgcc aggcggcgga gatcctccgc gaccgcgcg accagcgcga gctgctggac	1080
ccgcgcggcg cgcagctaa ccagttgcc ctgcattccc tgccatcgat tcggccatg	1140
caggatatcg tcaacagcga cgtcacgtt accgtggaca tggcgcgtt ccatactgg	1200
attgcccgtt acctgtacac gttccgcgc cgtcaggatgatctccaa cggccagcag	1260
accatggcgcc tcggcctgcc ctggcgtatc ggcgcctggc tggcaatcc tgagcgcata	1320
gtggctccg tctccggcga cggcgcttc ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgc	1380

gtccgcctga aagccaaacgt gtcgcattt atctgggtcg ataacggcta caacatggc	1440
--	------

gctatccagg aagagaaaaa atatcagcgc ctgtccggcg tcgagttgg gccgatggat 1500
 tttaaaggct atgccaatc cttcggcgcg aaagggttg ccgtggaaag cgccgaggcg 1560
 ctggagccga ccctgcgcgc ggcgatggac gtcgacggcc cggcggtagt ggccatcccg 1620
 gtggattatc gcgataaccc gctgctgatg ggccagctgc atctgagtca gattctgtaa 1680

<210> 2

<211> 559

<212> PRT

<213> 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														
Pro	Gly	Ala	Lys	Ile	Asp	Lys	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Ser
35	40														
Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Val	Arg	His	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	Phe	Met	Ala
50	55														
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														
Ser	Glu	Gly	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Arg	Ala
100	105														
Asp	Lys	Ala	Lys	Gln	Val	His	Gln	Ser	Met	Asp	Thr	Val	Ala	Met	Phe
115	120														
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														
Gly	Ser	Ala	Phe	Val	Ser	Leu	Pro	Gln	Asp	Val	Val	Asp	Gly	Pro	Val
165	170														
Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Ala	Ser	Gly	Ala	Pro	Gln	Met	Gly	Ala	Ala

180	185	190
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

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> Escherichia coli

<400> 3

atggctaact acttcaatac actgaatctg cgccagcagc tggcacagct gggcaaatgt 60
cgctttatgg gccgcgatga attcgccat ggcgcgagct acttcaggg taaaaaagta 120

gtcatcgctcg gctgtggcgc acagggtctg aaccaggccc tgaacatgct tgattctgg 180

ctcgatatact cctacgctct gcgtaaagaa gcgttgcgc agaagcgcc gtcctggcg 240

aaagcgaccg aaaaatggtt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcgat 300

ctggtgatta acctgacgcc ggacaaggcag cactctgatg tagtgcgcac cgtacagcca 360

ctgatgaaag acggcgccgc gctggctac tcgcacggtt tcaacatcgt cgaagtggc 420

gagcagatcc gtaaagatat caccgtatgt atggttgcgc cgaaatgccc aggcaccgaa 480

gtgcgtgaag agtacaaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattccgt tcacccgaa 540

aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcgctgc aaccggtggt 600

caccgtgcgg gtgtgctgga atcgtcctc gttgcggaa tgaaatctga cctgatggc 660
 gagcaaacca tcctgtgcgg tatgttgcag gctggcttc tgctgtgctt cgacaagctg 720
 gtggagaaga gtaccgatcc agcatacgca gaaaaactga ttcaagttcg ttggaaacc 780
 atcaccgaag cactgaaaca gggcggcatc accctgatga tggaccgtct ctctaaccg 840
 gcgaaactgc gtgcttatgc gcttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc 900
 cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattcttt ccggtatgat ggcgactgg 960

gccaacgatg ataagaaact gctgacctgg cgtgaagaga cggcaaaac cgcgttgaa 1020
 accgcgccgc agtatgaagg caaaatcgcc gagcaggagt acttcgataa aggctactg 1080
 atgatggca tggtaaagg gggcgttga ctggcgatcg aaaccatggc cgatccggc 1140
 atcattgaag agtctgcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaaacc 1200
 atcggccgta agegtctgta cgaaatgaaatgttact ctgataccgc tgagtacggt 1260
 aactatctgt tctttacgc ttgtgtgccc ttgctgaaac cgttatggc agagctgcaa 1320
 cggcgacc tggtaaagc tattccggaa ggccggtag ataacggca actgcgtgat 1380

gtgaacgaag cgattcgcag ccatgcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcggctat 1440
 atgacagata tggtaaactgat tgctgttgcg ggttaa 1476

<210> 4

<211> 491

<212> PRT

<213> 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 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

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
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
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> Escherichia coli

<400> 5

atgcctaagt accgttccgc caccaccact catggtcgta atatggcggt tgctcggtcg	60
ctgtggcgcg ccacccgaat gaccgacgcc gatttcggta agccgattat cgccgttgt	120
aactcggtca cccaaattgtt accgggtcac gtccatctgc gcgatctcg taaactggtc	180
gccgaacaaa ttgaagcgcc tggcggtttt gccaaagagt tcaacaccat tgccgtggat	240
gatgggattt ccatgggcca cggggggatg ctttattcac tgccatctcg cgaactgatc	300
gctgattccg ttgagtatat ggtcaacgcc cactgccc acgccatggt ctgcattct	360
aactgcgaca aaatcacccc ggggatgctg atggctccc tgccctgaa tattccggtg	420

atctttttt ccggcgcccc gatggaggcc gggaaaacca aactttccga tcagatcatc	480
aagctcgatc tggatgc gatgatccag ggcgcagacc cggaaatgtatc tgactcccg	540
agcgatcagg ttgaacgttc cgcgtgtcc acctgcgtt cctgctccgg gatgttacc	600
gctaactcaa tgaactgcct gaccgaagcg ctggcgtgt cgcagccgg caacggctcg	660
ctgctggcaa cccacgccga ccgtaagcag ctgttccctt atgctggtaa acgcattgtt	720
gaattgacca aacgttattt cggcaaaac gacgaaatgt cactgccgca taatatcgcc	780

agtaaggcgg cgttgaaaa cgccatgacg ctggatatcg cgatgggtgg atcgactaac	840
accgtacttc acctgctggc ggcggcgcag gaagcggaaa tcgacttcac catgagtgtat	900
atcgataagc ttcccgcaa ggttccacag ctgttaaag ttgcgcgag caccggaaa	960
taccatatgg aagatgttca ccgtgctggt ggtgttatcg gtattctcg cgaactggat	1020
cgcgcgggt tactgaaccg tggatgtgaaa aacgtacttg gcctgacgtt gcccggaaac	1080
ctggaaacaat acgacgttat gctgacccag gatgacgcgg taaaaaatat gttccgcga	1140
ggtcctgcag gcattcgtac cacacaggca ttctcgcaag attgccgtt ggatacgctg	1200

gacgacgatc ggcggcaatgg ctgtatccgc tcgctggaaac acgcctacag caaagacggc	1260
ggcctggcgg tgctctacgg taactttcg gaaaacggct gcatgtgaa aacggcaggc	1320
gtcgatgaca gcatcctcaa attcaccggc cggcgaaag tgtacgaaag ccaggacgat	1380
gcggtagaaag cgattctcg cggtaaagtt gtcgcggag atgtggtagt aattcgctat	1440
gaaggcccga aaggcggtcc gggatgcag gaaatgcctt acccaaccag cttctgaaa	1500
tcaatggtc tcggcaaagc ctgtgcgtt atcaccgacg gtcgttctc tggggcacc	1560
tctggtctt ccattggcca cgtctcacgg gaagcggcaa gcccggcag cattggcctg	1620

attgaagatg gtgacctgat cgctatcgac atcccgaaacc gtggcattca gttacaggta	1680
agcgatgccc aactggcgcc gcgtcgtaa ggcgcaggacg ctcgagggtga caaagcctgg	1740
acgcggaaaa atcgtaacg tcaggctcc ttgccttcg gtcttatgc cagccggca	1800
accagcgccg acaaaggcgc ggtgcgcgtt aaatcgaaac tgggggtta a	1851

<210> 6

<211> 616

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 6

Met Pro Lys Tyr Arg Ser Ala 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
 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
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
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		
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
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 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> Lactococcus lactis

<400> 7

atgtatactg tgggggatta cctgctggat cgcctgcacg aactggggat tgaagaaatt	60
ttcgggtgtgc caggcgattta aacacctgcag ttccctggacc agattatctc gcacaaagat	120
atgaagtggg tcggtaacgc caacgaactg aacgcgagct atatggcaga tggttatgcc	180
cgtaccaaaa aagctgctgc gtttctgacg accttggcg ttggcgaact gagcgccgtc	240

aacggactgg caggaagcta cgccgagaac ctgccagttg tcgaaattgt tgggtcgccct	300
actttctaagg ttcagaatga aggcaattt gtgcaccata ctctggctga tggggatttt	360
aaacatttta tgaaaatgca tgaaccggtt actgcggccc gcacgctgct gacagcagag	420
aatgctacgg ttgagatcga ccgcgtcctg tctgcgtgc tgaaagagcg caagccgta	480
tataatcaatc tgcctgtcga ttttgcgcga gcgaaagccg aaaagccgtc gctgccactg	540
aaaaaaagaaa acagcacctc caatacatcg gaccaggaaa ttctgaataa aatccagggaa	600
tcactgaaga atgcgaagaa accgatcgatc atcaccggac atgagatcat ctctttggc	660

ctggaaaaaaa cggtcacgca gttcattttt aagaccaaac tgcctatcac caccctgaac	720
--	-----

ttcggcaaat ctagcgtcga tgaagcgctg ccgagtttc tggtatcta taatggtacc	780
ctgtccgaac cgaacctgaa agaattcgtc gaaagcgccg acttatcct gatgctggc	840
gtgaaaactga cggatagctc cacaggcga tttaccacc atctgaacga gaataaaatg	900
atttccctga atatcgacga aggcaaaatc tttaacgagc gcatccagaa cttcgat	960
gaatctctga ttagttcgct gctggatctg tccgaaattg agtataaagg taaatatatt	1020
gataaaaaac aggaggattt tgtccgtct aatgcgtc tgagttagga tcgtctgtgg	1080

caagccgtag aaaacctgac acagtcta at gaaacgattt ttgcggaaaca ggaaacttca	1140
ttttcggcg cctcatccat ttttctgaaa tccaaaagcc atttcatgg ccaaccgtg	1200
tggggagta ttgttatac cttccggcg ggcgtgggtt cacagattgc agataaggaa	1260
tcacgccatc tgctgttat tggtgacggc agcctgcagc tgactgtcca ggaactgggg	1320
ctggcgatcc gtgaaaaat caatccgatt tgcttatac tcaataacga cggctacacc	1380
gtcgaacgca aaattcatgg accgaatcaa agttacaatg acatccgat gtgaaactat	1440
agcaaactgc cggaaatcctt tggcgcgaca gaggatcgcg tggtagttaa aattgtgcgt	1500

acggaaaacg aatttgcgtc gtttatgaaa gaagcgagg ctgaccgaa tcgcatgtat	1560
tggattgaac tgatcctggc aaaagaaggc gcaccgaaag ttctgaaaaa gatggggaaa	1620
ctgtttcgaa agccaaataa aagctaa	1647

<210> 8

<211> 548

<212> PRT

<213> 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

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

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

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

<213> Achromobacter xylooxidans

<400> 9

atgaaaagctc tggtttatca cggtgaccac aagatctcg	60
ttgaagacaa gcccaagccc	
acccttcaaa agcccacgga ttagtagta cgggtttga agaccacgt	120
ctgcggcag	
gatctcgca tctacaaagg caagaatcca gaggtcgccg acgggcgt	180
cctggccat	
gaagggtag ggtcatcg ggaagtggc gagagtgtca cgca	240
gaaaggcag	
aaggctcga ttctcgct cacttcttgc ggctcg	300
actactgca aagcagctt	
tactccatt gccgcgacgg cgggtggatc ctgggttaca tgatcgatgg	360
cgtgcaggcc	

gaataacgtcc gcatcccgca tgccgacaac agccctaca agatccccca	420
gacaatttgc	
gacgaaatcg ccgtcctgct gagcgacatc ctgcccac	480
gacgaaatcg cggcgtccag	
tatgggaatg tccagccggg cgtgcgg	540
gtcgatcg	
tccgtactgt tgaccgccc	600
gttctactcc ccctcgacca tcatcgatcg	
cgacatggac	
gagaatcgcc tccagctcg	660
caaggagctc gggcaacgc acaccatcaa ctccggc	
acg	
gagaacgttg tcgaaaggcgt	720
gcataggatt gcccagagg gagtcgatgt tgcatcgag	
gcgg	
gcggca taccggc	780
gac ttggacatc tgccaggaga tcgtcaagcc cggcgc	
gac	

atcgccaacg tcggcgtca	840
ttgacttcg agattcagaa gctctggatc	
aagaacctga cgatcaccac gggactgg	900
tg aacacgaaca cgacccc	
gtcgctcg	960
ccgacaagct ccgttgaag aagatgat	
ccatcgctt cgagctggcc	
gagatcgagc acgcctatca ggtattc	1020
tc aatggccca aggagaaggc gatgaagatc	
atccctcgatcgac tgcctga	1047

<210> 10

<211> 348

<212> PRT

<213> Achromobacter xylooxidans

<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
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
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
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

340 345

<210> 11

<211> 1713

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 11

ttgacaaaag caacaaaaga acaaaaatcc cttgtgaaaa acagagggc ggagcttgg	60
gttgattgct tagtgaggca aggtgtcaca catgtatttgcattccagg tgcaaaaatt	120
gatgcgttat ttgacgctt acaagataaa ggacctgaaa ttatcgttgc cggcacgaa	180
caaaacgcag cattcatggc ccaaggcgtc ggccgtttaa ctggaaaacc gggagtcgt	240

ttagtacat caggaccggg tgcctctaacttggcaacag gcctgctgac agcgaacact	300
gaaggagacc ctgtcggtgc gcttgctgga aacgtgatcc gtgcagatcg tttaaacgg	360
acacatcaat ctttgataa tgcggcgta ttccagccgatcataaaata cagtgtagaa	420
gttcaagatg taaaaatat accggaagct gttacaaatgcatttagat agcgtcagca	480
ggcaggctg gggccgttt tggagctt ccgcaagatgttgcataatgatcacaat	540
acgaaaaacg tgcgtgctgt tgcagcgcca aaactcggcctgcagcataatgcata	600
agtgcggcca tagcaaaaat ccaaacagca aaacttcgtcgtttttgtt cggcatgaaa	660

ggcggaaagac cggaagcaat taaagcggtt cgcaagctt tgaaaaaggt tcagcttcca	720
tttggtaaa catatcaagc tgccggtaacc ctttcttagat atttagagga tcaatatttt	780
ggccgtatcg gtttggccgtaaccaggcttgcgttac tgctagagca ggcagatgtt	840
gttctgacga tcggctatga cccgattgaa tatgatccga aattctggaa tatcaatggaa	900
gaccggacaa ttatccattt agacgagatt atcgctgaca ttgatcatgc ttaccaggct	960
gatcttgaat tgatcggtga cattccgtcc acgatcaatc atatcgaaca cgtatgtgt	1020
aaagtggaat ttgcagagcg tgagcagaaa atccttcgtt attaaaaaca atatatgtat	1080

gaaggtgagc aggtgcgtc agattggaaa tcagacagag cgcaccctct tgaaatcg	1140
aaagagttgc gtaatgcgtc cgtatgcgtat gttacagtaa cttgcgtatcgac	1200

gccatggta tgtcacgtta ttccgcgc tacgagccgt taacatata gatcagtaac	1260
ggatgcaaa cactcgccgt tgccgttctt tggcaatcg gcgcattcatt ggtgaaaccg	1320
ggagaaaaag tggttctgt ctctgggtac ggccgttctt tattctcagc aatggatta	1380
gagacagcag ttcgactaaa agcaccaatt gtacacatg tatggaacga cagcacatat	1440
gacatggttc cattccagca attgaaaaaa tataaccgta catctgcgtt cgatttcgga	1500

aatatcgata tcgtgaaata tgccggaaagg ttccggagcaa ctggcttgcg cgttagaatca	1560
ccagaccagg tggcagatgt tctgcgtcaa ggcataacg ctgaagggtcc tgtcatcatc	1620
gatgtcccggtt gactacag tgataacatt aattagcaa gtgacaagct tccgaaagaa	1680
ttcggggaaac tcatgaaaac gaaagcttc tag	1713

<210> 12

<211> 570

<212> PRT

<213> 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
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		
225	230	235
Phe Val Glu Thr Tyr Gln Ala Ala Gly Thr Leu Ser Arg Asp Leu Glu		
245	250	255
Asp Gln Tyr Phe Gly Arg Ile Gly Leu Phe Arg Asn Gln Pro Gly Asp		
260	265	270
Leu Leu Leu Glu Gln Ala Asp Val Val Leu Thr Ile Gly Tyr Asp Pro		
275	280	285
Ile Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Trp Asn Ile Asn Gly Asp Arg Thr Ile		
290	295	300
Ile His Leu Asp Glu Ile Ile Ala Asp Ile Asp His Ala Tyr Gln Pro		
305	310	315
Asp Leu Glu Leu Ile Gly Asp Ile Pro Ser Thr Ile Asn His Ile Glu		
325	330	335
His Asp Ala Val Lys Val Glu Phe Ala Glu Arg Glu Gln Lys Ile Leu		
340	345	350
Ser Asp Leu Lys Gln Tyr Met His Glu Gly Glu Gln Val Pro Ala Asp		
355	360	365
Trp Lys Ser Asp Arg Ala His Pro Leu Glu Ile Val Lys Glu Leu Arg		
370	375	380

Asn Ala Val Asp Asp His Val Thr Val Thr Cys Asp Ile Gly Ser His
 385 390 395 400

Ala Ile Trp Met Ser Arg Tyr Phe Arg Ser Tyr Glu Pro Leu Thr Leu
 405 410 415

Met Ile Ser Asn Gly Met Gln Thr Leu Gly Val Ala Leu Pro Trp Ala
 420 425 430

Ile Gly Ala Ser Leu Val Lys Pro Gly Glu Lys Val Val Ser Val Ser
 435 440 445

Gly Asp Gly Gly Phe Leu Phe Ser Ala Met Glu Leu Glu Thr Ala Val
 450 455 460

Arg Leu Lys Ala Pro Ile Val His Ile Val Trp Asn Asp Ser Thr Tyr
 465 470 475 480

Asp Met Val Ala Phe Gln Gln Leu Lys Lys Tyr Asn Arg Thr Ser Ala
 485 490 495

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> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 13

atgttgagaa ctcaagccgc cagattgatc tgcaactccc gtgtcatcac tgctaaagaga 60
 acctttgctt tggccacccg tgctgctgct tacagcagac cagctgcccg tttcgtaag 120

ccaatgatca ctacccgtgg tttgaagcaa atcaacttcg gtggtaactgt taaaaccgtc	180
tacgaaagag ctgactggcc aagagaaaag ttgttgact acttcaagaa cgacacttt	240
gctttgatcg gttacggttc ccaaggtaac ggtcaagggt tgaacttgag agacaacggt	300
ttgaacgtta tcattgggtg cgttaaagat ggtgctt ggaaggctgc catcaagac	360
ggttgggttc caggcaagaa ctgttcaact gttgaagatg ctatcaagag agtagttac	420
gttatgaact tttgtccga tgccgctcaa tcagaaacct ggctgttat caagccattg	480
ttgaccaagg gtaagacttt gtacttctcc cacggttct cccagttt caaggacttg	540

actcacgtt aaccacccaaa ggacttagat gttatcttgg ttgctccaaa gggttccgg	600
agaacgtca gatctttgtt caaggaaggc cgtggattta actcttctta cgccgtctgg	660
aacgatgtca ccggtaaggc tcacgaaaag gcccaagctt tgccgttgc cattggttcc	720
ggttacgttt accaaaccac ttctgaaaga gaagtcaact ctgacttgta cggtgaaaga	780
ggttgtttaa tgggtgtat ccacggatg ttcttggtc aatacgacgt ctggagagaa	840
aacggtaact cccatctga agcttcaac gaaaccgtcg aagaagctac ccaatctcta	900
taccattga tcggtaagta cggtatggat tacatgtacg atgcttggtc caccaccggcc	960

agaagaggtg cttggactg gtacccaatc ttcaagaatg cttgaagcc tgtttccaa	1020
gacttgtacg aatctaccaa gaacggtacc gaaaccaaga gatcttgaa attcaactct	1080
caacctgact acagagaaaaa gctagaaaag gaatttagaca ccatcagaaaa catggaaatc	1140
tggaaggttt gtaaggaagt cagaaagttt agaccagaaaa accaataaa	1188

<210> 14

<211> 395

<212> PRT

<213> *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 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

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> artificial sequence

<220><223> Mutant of Pseudomonas fluorescens ilvC coding region

<400> 15

atgaagggtt tttacgataa agactgcgt ctgagcatca tccagggaaa gaagggttgc	60
attataggat atggttccca aggacacgca caagccttga acttggaaaga ttctggggtc	120
gacgtgacag taggtctgtt taaagggtct gctgtatgcag caaaggctgtt agcacatggc	180
tttaaagtca cagatgttgc agccgtgtt gctggcgctg atttagtcat gattttatt	240
ccagatgaat ttcaatcgca attgtacaaa aatgaaatag aaccaaacat taagaaggc	300
gctaccttgg ctttcgttca tggatttgcattcattaca atcaagtatgt ccccaggc	360

gatttggacg ttattatgtat tgcacctaag gctccggggc atactgttag gagcgtttttt	420
gttaagggtt gtggatttcc agatttgtatc gctatatacc aagacgttag cgaaacgct	480
aagaatgttag cttaagctt cgcagcagga gttgggtggcg ggagaacggg tataatagaa	540
accacttttta aagacgagac tgagacagat ttatggag aacaagcggt tctgtgcgg	600
ggaactgttg aattggttaa agcaggctt gagacgttgc tcaagcagg gtacgtccc	660
gaaatggcat acttcgaatg tctacatgaa ttgaagttga tagtagactt aatgtatgaa	720
gggtgtatag ctaatatgaa ctattccatt tcaaataatg cagaatatgg tgagtatgtc	780

accggacactg aagtcatataa cgcagaatca agacaagcca tgagaaatgc cttgaaacgt	840
atccaggacg gtgaatacgc taagatgttc ataagtgaag ggcgtacggg ttacccgagt	900

atgactgcta aaagaagaaa caatgcagca catggtatcg aaattattgg tgaacagtta 960
 aggtctatga tgccctggat cggtgctaat aagatcgtag acaaggcgaa aaat 1014
 <210> 16
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> artificial sequence
 <220><223> mutant of *Pseudomonas fluorescens* protein
 <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

 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 Ala Val 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> Streptococcus mutans

<400> 17

atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaatcgta gttctgttta cgattcaatg	60
gttaaatcac ctaatcgtgc tatgttgcgt gcaactggta tgcaagatga agactttgaa	120
aaacctatcg tcgggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta	180
catgactttg gtaaaacttagc caaagtgggt gttaaggaag ctggtgcttg gccagttcag	240
ttcggaaaca tcacggtttc tcatggaaatc gcatggaa cccaaggaat gcgtttctcc	300
ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg	360

gatgcttttg tagccattgg cggttgtat aaaaacatgc ccggttctgt tatcgctatg	420
gctaacatgg atatcccagc cattttgc tacggcggaa caattgcacc tggtaattta	480
gacggcaaag atatcgattt agtctctgtc tttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc	540
gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg cttgtcccggtcctggaggc	600
tgcgggttatactgc taacacaatg gcgacagctt ttgaagttt gggacttagc	660
cttccgggtt catcttctca cccggctgaa tccgcagaaaa agaaagcaga tattgaagaa	720
gtctgttcggc ctgttgtcaa aatgtcgaa atgggcttaa aacctctga cattttaacg	780

cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggagggttc aaccaactca	840
acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaatgtgg aattgacact tgaatgattc	900
aatactttcc aagaaaaagt tcctcatttg gctgatttga aacctctgg tcaatatgtt	960
ttccaagacc tttacaaggt cgagggggta ccagcagtttga taaaatatct cttaaaaat	1020
ggtttccttc atggtgaccg tatcaattgtt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag	1080
gcttttgatg atttaacacc tggtcaaaag gtttattatgc cgcttggaaa tcctaaacgt	1140
gaagatggtc cgctcattat tctccatggt aacttggctc cagacggtgc cgttggcaaa	1200

gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggtcctgcta aggtcttaa ttctgaagaa	1260
gaagccatig aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg gtgatgttgt tgtcgtaact	1320
ttttaggac caaaggcggt tcctggatg cctgaaatgc tttcccttc atcaatgatt	1380
gttggtaaag ggcaaggtaa aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctcaagggtt	1440
acttatggtc ttgtcggtgg tcatacgct cctgaagcac aagatggcggt tccaatcgcc	1500
tacctgcaaa caggagacat agtcaactt gaccaagaca ctaaggatt acactttgat	1560
atctccgatg aagagttaaa acatcgtaa gagaccattt aattgcacc gctctattca	1620

cgcggtatcc ttggtaata tgctcacatc gttcgtctg cttctagggg agccgtaca 1680
gactttgga agcctgaaga aactggcaaa aaa 1713

<210> 18

<211> 571

<212> PRT

<213> *Streptococcus mutans*

<400> 18

Met Thr Asp Lys Lys Thr Leu Lys Asp Leu Arg Asn Arg Ser Ser Val

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 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

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 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 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

Asp Phe Trp Lys Pro Glu Glu Thr Gly Lys Lys

565 570

<210> 19

<211> 1644

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Bacillus subtilis kivD coding region codon optimized for
expression is S. cerevisiae

<400> 19

atgtatacag taggtgacta tctgttggac agattacacg aattaggtat agaagaata	60
ttcgaggatc caggtgacta caatttgaa tttctagatc aaatttatttc acacaaagat	120
atgaaatggg tggaaatgc taatgagttt aatgcctcct atatggccga cgggtacgca	180

agaacgaaaa aggctgcggc attcttgact acatttggtg ttggcgaatt atccgcagtt	240
aatggcttag cgggctccta tgctgagaac ctgcctgtg tttagatcgt gggatctcct	300
acctcgaaag tgcagaacga aggttaagttt gttcaccata cgttggctga tggtgatttc	360
aagcacttta tgaagatgca cgaaccgggtt actgctgccca ggactttattt gacagccgag	420
aatgcaactg ttgaaattga tagagtgtt tctgccttac taaaggaaag aaagccgggtt	480
tacatcaatt tacctgtaga ttagtgccttac gcttaaggctg aaaaaccatc cttgccttt	540
aagaaggaaa attccacgatc gaatacatct gatcaagaga ttctgaacaa aatacaggaa	600

agtctgaaga atgccaagaa accaatttta atcacaggcc atgaaattat atcggtcgcc	660
ctagagaaga ctgttactca gtttatttca aagactaagt tacctattac tactttgaac	720
tttggtaaat catctgttga tgaagcatttgc ccctcatttt tggggattta caacggact	780
ctgtcagagc caaaacttggaa ggaatttggtg gaatctgcgt attttattct tatgttgggt	840
gtaaagctta ccgattcttag tacgggtgca tttactcacc atcttaatga aaataaaatg	900
atttccttga atatcgatga aggtaaaattt ttcaacgaaa gaatccaaaa ttgcacttc	960
gaatccctga tatcatctt tcttgacttg tccgaaatttgc aatataaagg caagttacata	1020

gataaaaaagc aagaagattt tgtaccttctt aacgcgcgtgt tgcacaaga tagactgtgg	1080
---	------

caagctgtcg aaaatttgac ccaaagtaat gagacgatcg tggctgaaca aggcaattct	1140
ttcttcggtg cctcatctat atttctgaaa tcgaaatcac attttattgg tcaacccttg	1200
tgggatcta taggatacac ttccccgca gctctaggca gccaaattgc agataaagaa	1260
tctagacatt tattgttat cggagatgga tcattgcaac tgactgtcca agaatttagga	1320
ctagccatta gagagaagat aaacccaatc tgcttatca ttaataacga tggttacacg	1380
gtttagaggg aaattcatgg tccgaaccag agttataatg acattctat gtggattac	1440

tcaaaactgc cagaaagttt cggggcaacg gaagacagag ttgtgtccaa aattgtgaga	1500
acagaaaatg aattcgtatc cgtgatgaaa gaagctcaag cagatccaa taggatgtat	1560
tggatagaac ttattctagc aaaggagggt gcacctaag tttgaaaaa gatggtaag	1620
ttatttgcag aacaaaacaa gagc	1644

<210> 20

<211> 548

<212> PRT

<213> 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
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
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
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

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 Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
 530 535 540

Gln Asn Lys Ser

545

<210> 21

<211> 2145

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> constructed chimeric gene

<400> 21

gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg	60
gagaatcttc taacgataaa cccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct	120
acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg attaaggct aaggcacgtg	180

caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcggtaagt gttcgccaaa ctttcggtt	240
aacacatca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tatatatata tatatatata	300
tatagccata gtgatgtcta agtaacctt atggatatt tcttaatgtg gaaagatact	360
agcgcgcga cccacacaca agcttcgtct ttcttigaag aaaagaggaa gctcgctaaa	420
tgggattcca cttdccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgaa acgtgaaga	480
ataaaaagag agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagttca tgatcgtat	540
gaacaatggt aacgagttgt ggctgttgcc agggagggtg gttctcaact tttatgtat	600
ggccaaatcg ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattcttt	660
cctcccttctt gtccttctt aattctgttg taattacctt ctttgtat ttttttgta	720
attattcttc ttaataatcc aaacaaacac acatattaca atagctagct gaggatgaag	780
gcattagttt atcatgggta tcacaaaatt tcgttagaag acaaaccaaa acccactctg	840
cagaaaccaa cagacgttgtt ggttagggtg ttgaaaacaa caattgcgg tactgacttg	900
ggaatataca aaggtaaagaa tcctgaagtg gcagatggca gaatcctggg tcatgaggc	960
gttggcgtca ttgaagaagt gggcaatcc gtgacacaat tcaaaaaggg ggataaagtt	1020
ttaatctcct gcgttactag ctgtggatcg tgtgattatt gcaagaagca actgtattca	1080
cactgttagag acgggtggctg gattttaggt tacatgatcg acgggtgtcca agccgaatac	1140
gtcagaatac cacatgctga caattcattt tataagatcc cgcaaaactat cgatgatgaa	1200
attgcgtac tactgtccga tattttacct actggacatg aaattgggt tcaatatgg	1260
aacgttcaac caggcgatgc tgttagcaatt gtaggacatg gtcctgttgg aatgtcagtt	1320
ttgttaactg ctaaattttt ctgcctagt accattattt ttatcgacat ggacgaaaac	1380
cgttacaat tagcgaagga gttggggcc acacacacta ttaactccgg tactgaaaat	1440
gttgcgaag ctgtgcacatcg tatagcagcc gaaggagttt atgttagcaat agaagctgtt	1500
ggtataccgg caacctggga catctgtcgt gaaattgtaa aacccggcgc tcatattgcc	1560
aacgtggag ttcatgggtt taaggtggac ttgaaattt aaaaatgtt gattaagaat	1620
ctaaccatca ccactggttt gtttaacact aatactaccc caatgttgat gaaggtggcc	1680
tctactgata aattgcctttt aaagaaaatg attactcaca gtttgagtt agctgaaatc	1740
gaacacgcat atcagggtttt ctgttatggc gctaaagaaa aagctatgaa gattattcta	1800
tctaatgcag gtgccgccta attaattaag agtaagcgaa ttcttatga ttatgtattt	1860
tttattattaa ataagttata aaaaaataa gtgtatacaa atttaaagt gactcttagg	1920
ttttaaaacg aaaattctta ttcttgatgtt actctttcct gtaggtcagg ttgccttc	1980
aggtatagca tgaggctcgctt cttattgacc acacctctac cggcatgcc agcaaatgcc	2040

tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa tgagttgatg	2100
aatctcggtg tgtatttat gtcctcagag gacaacacct gtggt	2145
<210> 22	
<211> 4280	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> vector	
<400> 22	
ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg gtcatagctg	60
tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata	120
aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgtca	180
ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaaacgc	240
gcggggagag gcgggttgcg tattgggcgc tcttccgtt cctcgctcac tgactcgctg	300
cgctcggtcg ttccggctcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt aatacggta	360
tccacagaat cagggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc	420
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg ttttccata ggctccgccc ccctgacgag	480
catcacaaaa atcgacgctc aagttagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	540
caggcgtttc cccctggaaag ctccctcggt cgctctccgt ttccgaccct gccgcttacc	600
ggataccgtt cgcctttct cccttcggga agcgtggcgc ttctcatag ctcacgtgt	660
aggtatctca gttcggtgtt ggtcggtcg tccaaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc	720
gttcagcccg accgctgcgc cttatccggta aactatcgta tttagtccaa cccggtaaga	780
cacgacttat cggcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgt	840
ggcggtgctt cagagttttt gaagttggc cctaaactacg gctacactacg aaggacagta	900
tttggtatct ggcgtctgtt gaagccaggta accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	960
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt ggttttttt tttgcaagca gcagattacg	1020
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatctt ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcgt	1080
tggaaacggaa actcacgtt aaggatttt gtcgtgtat tatcaaaaag gatcttacc	1140
tagatcctt taaataaaaa atgaagttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaact	1200
tggctgtaca gttaccaatg cttaaatcgtt gaggcaccta tctcagcgat ctgtcttattt	1260
cgttcatcca tagttgcctt actccccgtc gtgttagataa ctacgatacg ggagggtta	1320
ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagacccac gtcaccggc tccagattta	1380

tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggcctgc aacttatcc	1440
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttat	1500
agtttgcaca acgttgtgc cattgctaca ggcacgtgg tgcacgctc gtcgttggt	1560
atggctcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccaatgtt	1620
tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtct ccgatcggt tcagaagtaa gttggccga	1680
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgt	1740
agatgcttt ctgtgactgg ttagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg	1800
cgaccgagtt gctttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgcacaca tagcagaact	1860
ttaaaagtgc tcatcatgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg	1920
ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatctc agcatcttt	1980
actttcacca gcgttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaaatgccgc aaaaaaggga	2040
ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactttcc ttttcaata ttattgaagc	2100
atttatcagg gtattgtct catgagcgga tacatattt aatgtattt aaaaaataaaa	2160
caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctgacgtcta agaaaccatt	2220
attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggcctttcg tctcgcgct	2280
ttcggtgatg acggtaaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagttgt	2340
ctgtaagcgg atgcccggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tttggcggg	2400
tgtcgggct ggcttaacta tgcggcatca gaggatgt tactgagagt gcaccatatg	2460
cggtgtaaaa taccgcacag atgcgttaagg agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca	2520
ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgca tggatggcggg cctttcgct attacgccag	2580
ctggcgaaag gggatgtgc tgcaggcgaa ttaagttggg taacgcagg gtttcccg	2640
tcacgacgtt gtaaaacgc ggcacgtgaa ttgcagctcg gtaccccggt ctctgagaca	2700
gtatgtatgtt agtcatcgct ctaccgacgc gcaggaaag aaagaagcat tgcggattac	2760
gtattctaat gttcagcccg cggaaacgcca gcaaatcacc acccatgcgc atgatactga	2820
gtcttgcata cgctggctt ccagtgtact gagatgcac cataccacag ctttcaatt	2880
caattcatca tttttttttt attttttttt ttgattcggtttttt gaaattttttga	2940
ttcgtaatc tccgaacaga aggaagaacg aaggaaggag cacagactta gattggata	3000
tatacgcata tttttttttt aagaaacatg aaattgcacca gtattctaa cccaaactgca	3060
cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg	3120
tgctgctact cttttttttt ttgtttttt ttgtttttt tggatgttcg taccaccaag gaattactgg agtttagttga	3180
aacaaacttg tttttttttt ttgtttttt ttgtttttt tggatgttcg taccaccaag gaattactgg agtttagttga	3240

agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa aacacatgtg gatatcttga ctgattttc	3300
catggagggc acagttAAC cgctaaaggc attatccgcc aagtacaatt ttttacttt	3360
cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa tacagtcaaa ttgcagttact ctgcgggtgt	3420
atacagaata gcagaatggg cagacattac gaatgcacac ggtgtggtgg gcccaggtat	3480
tgttagcggt ttgaagcagg cggcagaaga agtaacaaag gaaccttagag gcctttgat	3540
gttagcagaa ttgtcatgca agggctccct atctactgga gaatatacta agggactgt	3600
tgacattgctg aagagcgaca aagattttgt tatcggtttt attgctcaaa gagacatggg	3660
tggaagagat gaaggtaacg attgggttatg tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa	3720
gggagacgca ttgggtcaac agtataaaac cgtggatgtat gtggctctca caggatctga	3780
cattattatt gtttgaagag gactatttgc aaaggaaagg gatgcttaagg tagagggtgt	3840
acgttacaga aaagcaggct ggaaagcata tttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa	3900
aactgttata taagtaaatg catgtatact aaactcacaa attagagctt caatttatt	3960
atatcagttt ttaccctatg cgggtgtaaa taccgcacag atgcgttaagg agaaaatacc	4020
gcatcaggaa attgttaaacg ttaatatttt gttaaaattt gcgttaattt tttgttaat	4080
cagtcattt tttaaccaat agggcgaat cggcaaaatc ttccggccgc ggaacgcccag	4140
caaattacca cccatgcgca tgatactgag tcttgcacac gctggcttc cagtgatgt	4200
acaacgagtt agccaagggtg agcacggatg tctaaattt aattacgttt taatatctt	4260
ttttccatat ctagggctag	4280
<210> 23	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg	30
<210> 24	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
gaacattaga atacgttaatc cgcaatgcac tagtaccaca ggtgttgtcc tctg	54

<210> 25		
<211> 54		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 25		
cagaggacaa cacctgtgg actagtgcac tgccggattac gtattctaat gttc	54	
<210> 26		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 26		
caccttggt aactcggtt atcatcac	28	
<210> 27		
<211> 100		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 27		
tttaagccg aatgagtgac agaaaaagcc cacaacttat caagtgtat tgaacaaagg	60	
gcgaaacttc gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg	100	
<210> 28		
<211> 98		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 28		
cccaatttgtt aaatattcaa caagagacgc gcagtgacgtt acatgcgtt tgcgttattc	60	
acggcgataa caccttggtt aactcggtt atcatcac	98	
<210> 29		
<211> 28		
<212> DNA		

<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 29		
tcggtttttg caaatgacc tgtgggcc	28	
<210> 30		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 30		
caaaagccca tgtcccacac caaaggatg	29	
<210> 31		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 31		
caccatcgcg cgtgcacac tgcacatg	26	
<210> 32		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 32		
gagaagatgc ggccagcaaa ac	22	
<210> 33		
<211> 2745		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220>		
><223> constructed coding region-terminator segment		
<400> 33		
atgactgaca aaaaaactct taaagactta agaaaatcgta gttctgttta cgattcaatg	60	
gttaaatcac ctaatcgatc tatgttgatc gcaactggta tgcaagatga agactttgaa	120	

aacacctatcg tcgggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta	180
catgacttgcgtt gtaaacttagc caaagtcgggtt gttaaggaag ctgggtgtt gccagttcag	240
ttcggaaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatggaa cccaaaggaat gcgttctcc	300
ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg	360
gatgcttttg tagccattgg cggttgtgat aaaaacatgc ccggttctgt tatcgctatg	420
gctaacatgg atatcccagc cattttgct tacggcggaa caattgcacc tggtaattta	480
gacggcaaaat atatcgattt agtctctgtc tttgaaggtg tcggccatttgaaccacggc	540
gatatgacca aagaagaagt taaagcttgcgtt gaatgtatgcgttccgg tcctggaggc	600
tgcgggttatactactgc taacacaatgcgttccgg tcctggaggc	660
cttccgggtt catcttcacccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa	720
gctggtcgctgttgcgttcaaaatgcgttccgg tcctggaggc	780
cgtgaagcttttgcgttccgg tcctggaggc	840
acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtgg aatttgactacttgcgttccgg tcctggaggc	900
aatactttcc aagaaaaaaatg tcctcatttgcgttccgg tcctggaggc	960
tttcaagacc ttacaaggcttccgg tcctggaggc	1020
gggttccttc atggtgaccg tattttgttgcgttccgg tcctggaggc	1080
gttttgcgttccgg tcctggaggc	1140
gaagatggtc cgctcattat tctccatggt aacttggctc cagacgggtc	1200
gtttctgggttccgg tcctggaggc	1260
gaagccatgttccgg tcctggaggc	1320
tttgcgttccgg tcctggaggc	1380
gttggtaaaggcgttccgg tcctggaggc	1440
acttatggtc ttgtcggtttccgg tcctggaggc	1500
tacccgttccgg tcctggaggc	1560
atctccgttccgg tcctggaggc	1620
cgcggtatcc ttggtaataatgcgttccgg tcctggaggc	1680
gacttttgcgttccgg tcctggaggc	1740
ggccgttccgg tcctggaggc	1800
taatggtaatgcgttccgg tcctggaggc	1860
gtcaatgacaaatgcgttccgg tcctggaggc	1920
ttttacaaatgcgttccgg tcctggaggc	1980

ggccagtcctatcgatctatgttttatgc	2040
tcatTTGGA GTCGCGATT GTCTCTGTT ATTCACAACT GTTTAATT TTATTCATT	2100
CTGGAACCTCTCGAGTTCTT TGTAAAGTCTT CTCAGTAGTAG CTTACTTTAT CCTCCAACAT	2160
ATTTAACCTC ATGTCATT CGGCTCTAA ATTTCCACA TCACTAAGTT CAACATCATC	2220
TTTAACTTG AATTATTCT CTAGCTCTC CAACCAAGCC TCAATTGCTCC TTGATTACT	2280
GGTGAAGAAGT GATACACTT GCGCGCAATC CAGGTCAAAA CTTCCGTCA AAGAATTAC	2340
CAATTCTCG ACATCATAGT ACAATTGTT TTGTTCTCC ATCACAAATT AATATACCTG	2400
ATGGATTCTT ATGAAGCGCT GGGTAATGGA CGTGTCACTC TACTTCGCTT TTTCCCTAC	2460
TCCTTTAGT ACGGAAGACA ATGCTAATAA ATAAGAGGGT AATAATAATA TTATTAATCG	2520
GCACAAAAAGA TTAAACGCCA AGCGTTAAT TATCAGAAAG CAAACGTCGT ACCAATCCTT	2580
GAATGCTCC CAATTGTATA TTAAGAGTCA TCACAGCAAC ATATTCTGT TATTAATTAA	2640
ATTATTATTG ATTTTGATA TTGTATAAAA AAACCAAATA TGTATAAAA AAGTGAATAA	2700
AAAATACCAA GTATGGAGAA ATATATTAGA AGTCTATACG TTAAA	2745
<210> 34	
<211> 99	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 34	
TCCTTCTCA ATTATTATTT TCTACTCATA ACCTCACGCA AAATAACACA GTCAAATCAA	60
TCAAAGTATG ACTGACAAAAA AAACCTCTAA AGACTTAAG	99
<210> 35	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 35	
GAACATTAGA ATACGTAATC CGCAATGCTT CTTCTTTTC CGTTAACGT ATAGACTTCT	60
AAATATTTCTCCATAC	77
<210> 36	
<211> 45	
<212> DNA	

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 36

aacggaaaa gaaagaagca ttgcggatta cgtattctaa tgttc 45

<210> 37

<211> 88

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 37

tatttttgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataatttagag attaaatcgc 60

caccttggct aactcggtgt atcatcac 88

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 38

gacttttggaa agcctgaaga aactggc 27

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 39

cttggcagca acaggactag 20

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 40

ccaggccat tcaacagact gtccgc 26

<210> 41

<211> 2347

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> constructed URA3 marker with flanking homologous repeat sequences

for HIS gene replacement and marker excision

<400> 41

gcattcggta ttacgtattc taatgttcag gtgttggaaag aagagctgct taaccggcg	60
---	----

gcccagggtg aagatccacg ctactttacc ctgcgtcg tc tggatttcgg cggctgtcg	120
ctttcgctgg caacgcgggt tgatgaagcc tggacggtc cgctctcc tt aaacggtaaa	180
cgtatcgcca cctcttatcc tcaacctgtc aagcgttatac tcgaccagaa aggcatctct	240
tttaaatcct gcttactgaa cggttctgtt gaagtcgccc cgcgtgccgg actggcggat	300
gcgatttgcg atctggtttc caccgggtgcc acgctggaaag ctaacggcct gcgcaagtc	360
gaagttatct atcgctcgaa agcctgcctg attcaacgcg atggcggaaat ggaagaatcc	420
aaacagcaac tgatcgacaa actgctgacc cgtattcagg gtgtgatcca ggcgcgcgaa	480

tcaaaataca tcatgtatca cgcaccgacc gaacgtctgg atgaagtcat ggtacctact	540
gagagtgcac cataccacag ctttcaatt caattcatca tttttttt attttttt	600
ttgatttcgg ttctttgaa attttttga ttctggtaatc tccgaacaga aggaagaacg	660
aaggaaggag cacagactta gattggata tatacgata tgcgtgtt aagaaacatg	720
aaattgccca gtattcttaa cccaaactgca cagaacaaa acctgcagga aacgaagata	780
aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg tgctgtact catcctagtc ctgttgctgc	840
caagctattt aatatcatgc acgaaaagca aacaaactt gttgttcat tggatgttcg	900

taccaccaag gaattactgg agtttagttga agcattaggt cccaaatatt gtttactaaa	960
aacacatgtg gatatcttga ctgattttc catggaggc acagttaagc cgctaaaggc	1020
attatccgcc aagtacaatt ttacttctt cgaagacaga aaatttgcgt acattggtaa	1080
tacagtcaaa ttgcgtact ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg cagacattac	1140
gaatgcacac ggtgtggtgg gcccaggat tggtagcggt ttgaaggcagg cggcagaaga	1200
agtaacaaag gaaccttagag gcctttgtat gtttagcagaa ttgtcatgca agggctccct	1260
atctactgga gaatatacta agggtactgt tgacattgcg aagagcaca aagatttgt	1320

tatcggttt attgctaaa gagacatggg tggaagagat gaaggttacg attgggttat	1380
tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac	1440

cgtggatgat gtggctctca caggatctga cattattatt gttggaagag gactattgc	1500
aaagggaaagg gatgctaagg tagagggtga acgttacaga aaagcaggct ggaaagcata	1560
tttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa aactgttata taagtaatg catgtatact	1620
aaactcacaa attagagctt caatattaatt atatcagttt ttaccctatg cggtgtgaaa	1680
taccgcacag atgcgttaagg agaaaaatacc gcatcaggaa attgtaaacg ttaatattt	1740

gttaaaatc gcgttaattttgttaat cagctcattttacaat aggccgaaat	1800
cggcaaaatc tcttagagtgc tggaagaaga gctgcttaac cgccgcgccc agggtaaga	1860
tccacgctac ttatccctgc gtcgtctgga tttcgccggc tgtcgcttt cgctggcaac	1920
gccggttgtat gaaggctggg acggtcgct ctccctaaac ggttaaacgta tcgcccaccc	1980
ttatcctcac ctgctcaagc gttatctcgacccagaaaggc atctctttaaatctcgctt	2040
actgaacggttctgttgaag tcgccccgctgactggatgcgttttgcgtatct	2100
ggtttccaccggtgccacgc tggaagctaa cggccgtcgcaagttatctatcg	2160

ctcggaaaggcc	tgcctgattc	aacgcgatgg	cggaaatggaa	gaatccaaac	agcaactgat	2220
cgacaaaactg	ctgaccgta	ttcagggtgt	gatccaggcg	cgcgaatcaa	aatacatcat	2280
gatgcacgca	ccgaccgaaac	gtctggatga	agtcatccag	tgtatgataca	acgaggtagc	2340
caaggtg						2347

<210> 42

<211> 80

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 42

cttcgaagaa tatactaaaa aatgaggcagg caagataaac gaaggcaag gcattgcgga 60
ttacgtattc taatgttcag 80

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 43

cttcgaagaa tatactaaaa aatgaggcagg caagataaac gaaggcaag gcattgcgga 60
ttacgtattc taatgttcag 80

<210> 44	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 44	
gacttgaata atgcagcggc gcttgc	26
<210> 45	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 45	
ccaccctctt caatttagcta agatcatagc	30
<210> 46	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 46	
aaaaatttat tctcatcgta aatgc	25
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 47	
ctgcagcgag gagccgtaat	20
<210> 48	
<211> 16387	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
><223> plasmid construct	

<400> 48

tcccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgtc atgtatgtat ctgtattaa	60
aacactttg tattatttt cctcatatat gtgtataggt ttatacggat gattaatta	120
ttacticacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tttactagt tagaaaaaga	180
cattttgct gtcagtcact gtcaagagat tctttgctg gcatttctc tagaagcaa	240
aagagcgatg cgttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca acgcaatatg	300
gattgtcaga atcatataaa agagaagcaa ataactcctt gtcttgatc aattgcatta	360
taatatcttc ttgttagtgc aatatcatat agaagtcatc gaaatagata ttaagaaaaa	420
caaactgtac aatcaatcaa tcaatcatcg ctgaggatgt tgacaaaagc aacaaaagaa	480
caaaaatccc ttgtgaaaaa cagagggcgc gagcttggttt tgattgctt agtggagcaa	540
ggtgtcacac atgtatttgg cattccaggt gcaaaaattt atgcggatt tgacgctta	600
caagataaaag gacctgaaat ttcgttgcc cggcacgaac aaaacgcagc attcatggcc	660
caagcagtcg gccgttaac tggaaaaccc ggagtctgt tagtcacatc aggaccgggt	720
gcctctaact tggcaacagg cctgctgaca gcgaacactg aaggagaccc tgtcggtcg	780
cttgcggaa acgtgatccg tgcagatgtg taaaacgga cacatcaatc tttggataat	840
gcggcgctat tccagccgat taaaaatac agtgtagaag ttcaagatgt aaaaaatata	900
ccggaagctg ttacaaatgc atttaggata gcgtcagcag ggcaggctgg ggccgcttt	960
gtgagcttc cgaaagatgt tgtgaatgaa gtcacaaata cgaaaaacgt gcgtgctgtt	1020
gcagcgccaa aactcggtcc tgcagcagat gatcaatca gtgcggccat agcaaaaatc	1080
caaacagcaa aacttcctgt cgtttggtc ggcataaag gcgaaagacc ggaagcaatt	1140
aaagcggttc gcaagctttt gaaaaagggtt cagctccat ttgttgaac atatcaagct	1200
gccggtaccc ttcttagaga tttagaggat caatatttg gccgtatcgg tttgtccgc	1260
aaccagctg gcgatttact gctagagcag gcagatgtt ttcgtacgtatcgat cggctatgac	1320
ccgatttgaat atgatccgaa attctggaa atcaatggag accggacaat tatccattt	1380
gacgagatta tcgctgacat tgatcatgt taccagctg atcttgcattt gatcggtgac	1440
attccgtcca cgtcaatca tatcgaacac gatgtgtga aagtggatt tgcagagcgt	1500
gagcagaaaa tccttctga tttaaaacaa tatatgcattt aaggtgagca ggtgcctgca	1560
gattggaaat cagacagagc gcaccctttt gaaatcgat aaggttgcg taatcgatc	1620
gatgtatcatg ttacagtaac ttgcgatatc gtttcgcacg ccattttggat gtcacgttat	1680
ttccgcagct acgagccgtt aacattaatg atcagtaacg gtatgcaaac actcgccgtt	1740
gcttcctt gggcaatcgg cgcttcattt gttggaaacccgg gagaaaaaagt gtttctgtc	1800

tctggtgacg gcggtttctt attctcagca atggaattag agacagcagt tcgactaaaa	1860
gcaccaattg tacacattgt atggaacgac agcacatatg acatggttgc attccagcaa	1920
ttgaaaaaat ataaccgtac atctgcggtc gattcggaa atatcgatat cgtgaaatat	1980
gcggaaagct tcggagcaac tggcttgcgc gtagaatcac cagaccagct ggcagatgtt	2040
ctgcgtcaag gcatgaacgc tgaaggcct gtcatcatcg atgtcccggt tgactacagt	2100
gataacatta atttagcaag tgacaagctt ccgaaagaat tcgggaaact catgaaaacg	2160
aaagctctct agttaattaa tcatgtattt agttatgtca cgcttacatt cacccctcc	2220
ccccacatcc gctctaaccg aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat	2280
ttatttttt atagttatgt tagtattaag aacgttattt atatttcaaa ttttctttt	2340
ttttctgtac agacgcgtgt acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaaggt	2400
tttgggacgc tcgaaggcatttaatttgcgg gcgccgcgc tagaactagt accacaggtg	2460
ttgtcctctg aggacataaa atacacacccg agattcatca actcatgtct ggagtttagca	2520
tatctacaat tgggtgaaat ggggagcgtt ttgcaggcat ttgctggca tgccggtaga	2580
gggtgtggta ataagagcga cctcatgtta tacctgagaa agcaacctga cctacagggaa	2640
agagttactc aagaataaga atttcgttt taaaacctaa gagtcacttt aaaatttgc	2700
tacacttatt tttttataa cttatataat aataaaaatc ataaatcata agaaatttgc	2760
ttactcttaa ttaatcaagc atctaaaaca caaccgttgg aagcgttgg aaccaactta	2820
gcatacttgg atagagtacc tcttgcgttgg cgaggtggag gtcaacccca actttgtttt	2880
cgttgagcca ttcccttatac agagactaat aggtcaatct ttttattatc agcatcaatg	2940
ataatctcat cccgtctct gaccaacccg ataggaccac ctgcggc ttcgggaaaca	3000
atgtggccga ttaagaaccc gtgagaacca ccagagaatc taccatcagt caacaatgca	3060
acatcttac ccaaaccgtta acccatcaga gcagaggaag gctttagcat ttcaggcata	3120
cctggcgac ctcttggacc ttcatatctg ataacaacaa cggttttttcc acccttcttgc	3180
atttcacctc ttccaaggc ttcaataaaag gcacccctt cttcgaaacac acgtgctcta	3240
cccttgaagt aagtacccctt cttaccggta attttacca cagtcaccc tggtgccaaat	3300
gaaccgtaca gaatttgcaa gtgaccgttgc gccttgattt ggtggagag tggcttaata	3360
atctcttgc ttcaggtag gttgggtgtt ttcttgcac gttctgccaat agtgcacccg	3420
gtacacgtca ttgtgttacc gtgcaacatg ttgtttcat atagatactt aatcacagat	3480
tgggtaccac caacgttaat caaatcgccat atgacgttattt taccagaagg tttgaagtca	3540
ccgatcaatg gtgttagtac actgattttt tggaaatcat ctggtgacaa cttgacaccc	3600
gcagagttagt gacacgttgc acaatgcaaa acagcattag tggaccaccc ggttgcaacg	3660

acataagtaa tggcgtttc aaaaggctct tttgtgagga tatcacgagg taaaatacc	3720
aattccattg tcttcttgat gtattcacca atgttgtcac actcagctaa cttcccttg	3780
gaaacggctg ggaaggaaga ggagtttgg aatggtcaaac ctagcactc agcggcagaa	3840
gccattgtgt tggcagtata cataccacca caagaaccag gacctggca tgcattgtcc	3900
acaacatctt ctcttcttc ttcatgtaaat tgcttggaaa tatattcacc gttaggatgg	3960
aacgcagaga cgatatcgat gtttttagag atcctgttaa aacctctagt ggagtagtag	4020
atgtaatcaa tgaagcggaa gccaaaagac cagagtagag gcctatagaa gaaactgcga	4080
tacctttgt gatggctaaa caaacagaca tcttttata ttttttact tctgtatatac	4140
gtgaagtgt aagtgataag cgaatttggc taagaacgtt gtaagtgaac aaggacac	4200
ttttgcctt caaaaagga ttaatggag ttaatcatg agattagtt ttcgttagat	4260
tctgtatccc taaaataactc ctttacccga cgggaaggca caaaagactt gaataatgc	4320
aaacggccag tagccaagac caaataatac tagagttac tggatgtttt aaacaggcat	4380
tacgtgtga actccaagac caatatacaa aatatcgata agttttctt gcccaccaat	4440
ttaaggagcc tacatcagga cagtagtacc attcctcaga gaagaggtat acataacaag	4500
aaaatcgcgt gaacacctta tataacttag cccgttattt agctaaaaaa cttgcaaaa	4560
tttctatga ataagaatac ttcagacgtg ataaaaattt actttctaact tcttctcagc	4620
ctgcccctat ctgttcttcc gctctaccgt gagaataaa gcatcgagta cggcagtcc	4680
ctgtcactga actaaaacaa taaggctagt tcgaatgtt aacttgcctt ctgtcaaact	4740
tctgagttgc cgctgtatgt acactgtgac aataattca aaccggttt acgggtctcc	4800
tccggtaccg gttctgccac ctccaaataga gctcagtagg agtcagaacc tctgcgggtgg	4860
ctgtcagtga ctcatccgctt ttcgttaagt tggcggtgt cacattcgc ccgtccccgc	4920
tcatcttgca gcaggcggaa attttcatca cgctgttagga cgaaaaaaa aaataattaa	4980
tcgtacaaga atcttggaaa aaaaatttggaa aaatttgtttaaaaaggat gacctaactt	5040
gactcaatgg ctttacacc cagtatttc ctttccttg tttgttacaa ttatagaagc	5100
aagacaaaaa catatagaca acctattcct aggagttata ttttttacc ctaccagcaa	5160
tataagtaaa aaacttagtat gaagggtttt tacgataaaag actgcgtatct gagcatcatc	5220
cagggaaaga agttgttat tataggatat gttcccaag gacacgcaca agccttgaac	5280
ttgaaagatt ctggggcgtca cgtgacagta ggtctgtata aaggtgtc tggcgctgat	5340
aaggctgaag cacatggctt taaagtacca gatgttgcag cggctgttgc tggcgctgat	5400

ctccttcctt ttccgttaga gcggatgtgg ggggagggcg tgaatgtaa cgtgacataa	7200
ctaattacat gattaattaa ttattggtt tctggctca actttctgac ttcccttacca	7260
accttccaga ttccatgtt tctgatggtg tctaattcct tttctagctt ttctctgttag	7320
tcaggtttagt agttgaattt caaagatctc ttggttcgg taccgttctt ggttagattcg	7380
tacaagtctt gaaaaacagg cttcaaagca ttcttgaaga ttgggtacca gtccaaagca	7440
cctcttctgg cggtggtgga acaagcatcg tacatgtaat ccataccgtt cttaccgatc	7500
aatgggtata gagattgggt agtttctcg acggttcgt taaaagctt agatgggag	7560
tgaccgttt ctctcaagac gtcgtattga gccaagaaca taccgtggat accaccatt	7620
aaacaacctc tticaccgtt caagtcagag ttgacttctc tticgaaagt gtttggtaa	7680
acgtaaccgg aaccaatggc aacggccaaa gcttgggcct ttctgtgagc cttaccggtg	7740
acatcgttcc agacggcgta agaagagtta ataccacgac cttecttgaaa caaagatctg	7800
acagttctac cggaaaccctt tggagcaacc aagataacat ctaagtcctt tggtggttca	7860
acgtgagtca agtccttgaa gactggggag aaaccgtggg agaagtacaa agtcttaccc	7920
tttgtcaaca atggcttgat agcaggccag gtttctgatt gagcggcatc ggacaacaag	7980
ttcataacgt aactacctt ctgtatagca tcttcaacag tgaacaagtt ctgcctgga	8040
acccaaccgt ctgcgtggc agccttccaa gaagcaccat cttaacggac accaatgata	8100
acgttcaaac cgttgtctc caagttcaaa ctttgcgtt aaccttggg accgttaccg	8160
atcaaagcaa aagtgtcgaa ctttgcgtt tccacaact ttctcttgg ccagtcagct	8220
cttcgtttaga cggttcaac agtaccacgg aagttgattt gttcaacat ctttcgttct	8280
agatttgaat atgttattact tggttatgtt tatatatgac aaaagaaaaa gaagaacaga	8340
agaataacgc aaggaagaac aataactgaa attgtatag aagtattatg tctttgttctt	8400
tttataataa atcaagtgc gaaatccgtt agacaacatg agggataaaa tttaacgtgg	8460
gcgaagaaga agaaaaaaag ttttgcgtt ggcgttattt aagcgatctg ttgtttagt	8520
atttttttt ttgtttagt caaagtgcgaa agagaacaga caaatggat taaccatcca	8580
atactttttt ggagcaacgc taagctcatg ctttccatt gttacgtgc tcagttgtta	8640
gatatggaaa gagaggatgc tcacggcagc gtgactccaa ttgagcccgaa aagagaggat	8700
gccacgtttt cccgacggct gctagaatgg aaaaaggaaa aatagaagaa tcccatcct	8760
atcattatattt acgtaatgac ccacacattt ttgagatttt caactattac gtattacgt	8820
aatcctgctg tcattatcat tattatctat atcgacgtat gcaacgtatg tgaagccaag	8880
taggcaatta tttagtactg tcagtattgt tatttatttc agatctatcc gcggtggagc	8940
tcgaattcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa	9000

cttaatcgcc ttgcagcaca tccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc	9060
accgatcgcc ctccccaca gttgcgcgc ctgaatggcg aatggccct gatgcggat	9120
tttccctta cgcacatgtg cggatttca caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtagc	9180
cgccctgt tag cggcgcatta agcgccggg gtgtgggtt tacgcgcagc gtgaccgcta	9240
cacttgcag cgccttagcg cccgctcct tcgccttcc ccctccctt ctcggccacgt	9300
tcgcggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg	9360
cttacggca cctcgacccc aaaaaacttgc atttgggtga tggttacgt agtggccat	9420
cgcctgata gacggttttt cgccttta cggtggagtc cacgttctt aatagtggac	9480
tcttgcgttca aactggaca acactcaact ctatctggg ctattttt gatttataag	9540
ggattttgcc gatttcggtc tattggtaa aaaatgagct gatthaacaa aaatttaacg	9600
cgaattttaa caaaatatta acgtttacaa tttatggtg cactctcagt acaatctgct	9660
ctgatgccgc atagttaaac cagccccgac acccgccaaac acccgctgac ggcgcctgac	9720
gggccttgtct gctcccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca	9780
tgtgtcagag gtttcacccg tcatcacca aacgcgcgag acgaaaggc ctcgtgatac	9840
gcctatttt ataggtaat gtcataaa taatggttc tttagacgtca ggtggcactt	9900
ttcggggaaa tgtgcgcga acccctattt gtttatttt ctaaatacat tcaaatatgt	9960
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	10020
ttagtattca acattccgt gtcgcctta ttccctttt tgccgcattt tgccctcctg	10080
ttttgtca cccagaaacg ctgggtaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	10140
gagtggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ctttgagagt ttgcgcgg	10200
aagaacgttt tccaaatgtg agcactttt aagttctgt atgtggcgcgtt gttatccc	10260
gtattgacgc cggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcgtt aatgacttgg	10320
tttagtactc accagtccaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	10380
gcagtgctgc cataaccatg agtataaca ctgcggccaa ctacttctg acaacgtcg	10440
gaggaccgaa ggagctaacc gttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccctg	10500
atcggtggaa accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgtgc	10560
ctgttagcaat ggcaacaacg ttgcgcacaac tattaaactgg cgaactactt actctagctt	10620
cccgcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgt	10680
cggcccttcc ggctggctgg ttattgtcg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc	10740
gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	10800
cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct	10860

cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagttactc atatatactt tagattgatt	10920
taaaaactca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttgat aatctcatga	10980
ccaaaatccc ttaacgttag tttcggtcc actgagcgtc agacccgta gaaaagatca	11040
aaggatctt ttgagatctt ttttctgc gcgtaatctg ctgttgcaa acaaaaaaac	11100
caccgctacc agcgggtgtt tggttgcgg atcaagagct accaactctt ttccgaaagg	11160
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtct tctagtgtag ccgtagttag	11220
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacataacct cgctctgcta atcctgttac	11280
cagttggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	11340
taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagctgg	11400
agcgaacgac ctacacggaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc	11460
ttcccgaaagg gagaaggcg gacaggtatc cggttaagcgg cagggtcgga acaggagagc	11520
gcacgaggga gcttccaggg gaaacgcctt ggtatctta tagtcgtgc gggtttcgcc	11580
acctctgact tgagcgtcga ttttgtat gtcgtcagg gggcggagc ctatggaaaa	11640
acgcgcagcaa cgcggccccc ttacggttcc tggcctttt ctggcctttt gctcacatgt	11700
tcttcctgc gttatcccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagttagctg	11760
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtgc agtgagcggag gaagcggaaag	11820
agcgcctaattt acgcaaaacccg cctctcccg cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc	11880
acgacaggtt tcccgactgg aaagcggca gtgagcgtca cgcaattat gtgagtttagc	11940
tcactcatta ggcacccag gcttacact ttatgttcc ggctgtatg ttgtgtggaa	12000
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttt	12060
ttctttccaa tttttttt ttgtcatta taaaatcat tacgaccggat attccgggt	12120
aataactgat ataattaaat tgaagctcta atttgtgagt ttagtataca tgcatttact	12180
tataatacag ttttttagtt ttgctggccg catcttctca aatatgttcc ccagcctgt	12240
tttctgttaac gttcacccctc taccttagea tcccttcctt ttgcaaatacg tcctttcca	12300
acaataataa tgtcagatcc tgttagagacc acatcatcca cggttctata ctgtgtaccc	12360
aatgcgtctc cttgtcatac taaacccaca cgggtgtca taatcaacca atcgttaacct	12420
tcatcttccacccatgtc tctttgagca ataaagccga taacaaatc tttgtcgctc	12480
ttcgcaatgt caacagtacc cttagtataat tctccagtag atagggagcc cttgcgtac	12540
aattctgtca acatcaaaag gcctcttaggt tcctttgtta ctcttcgtc cgcctgttc	12600

aaaccgctaa caataacctgg gcccaccaca ccgtgtcat tcgtaatgtc tgccattct	12660
gctattctgt atacacccgc agagtaactgc aatttgcactg tattaccaat gtcagcaat	12720
tttcgtctt cgaagagtaa aaaattgtac ttggcggata atgccttag cgcccttaact	12780
gtgcctcca tggaaaaatc agtcaagata tccacatgtg ttttagtaa acaaatttg	12840
ggacctaatg ctcaactaa ctccagtaat tcctgggtg tacgaacatc caatgaagca	12900
cacaagttt tttgttttc gtgcatgata ttaaatagct tggcagcaac aggacttagga	12960
tgagtagcag cacgttcctt atatgttagct ttgcacatga tttatctcg tttcctgcag	13020
gttttggc tgcgtttt ggttaagaat actggcaat ttcatgttc ttcaacacta	13080
catatgcgtatataccaa tctaagtcg tgctccttcc ttgcgttcttc cttctgttcg	13140
gagattaccg aatcaaaaaa attcaagga aaccgaaatc aaaaaaaaaga ataaaaaaa	13200
aatgtgaat tggaaagctt gcatgcgtc aggtcgactc tagtatactc cgtctactgt	13260
acgatacact tccgctcagg tcctgtcct ttaacgaggc ctaccactc tttgttact	13320
ctattgtatcc agtcagcaa aggcaatgtg atctaagatt ctatctcgc gatgttagaa	13380
aactagctag accgagaaag agactagaaa tgcaaaaggc acttctacaa tggctgccat	13440
cattattatc cgatgtgacg ctgcattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	13500
ttttttttt tttttttgtt caaatatcat aaaaaaagag aatctttta agcaaggatt	13560
ttcttaactt ctgcggcgtc agcatcacccg acttcgggtg tactgttgaa accaccta	13620
tcaccaggttc tgataccgtc atccaaaacc ttttaactg catcttcaat ggcttac	13680
tcttcaggca agttcaatga caatttcaac atcatgcag cagacaagat agtggcgata	13740
gggttgaccc tattttttgg caaatctgaa gcggaaccat ggcatttttc gtacaacca	13800
aatgcggtgt tcttgcgttgg caaagaggcc aaggacgcag atggcaacaa acccaaggag	13860
cctggataa cggaggcttc atcggagatg atatcaccaaa acatgttgct ggtgattata	13920
ataccattta ggtgggttgg gttcttaactt aggtatgg cggcagaatc aatcaattga	13980
tgttgaactt tcaatgttagg gaattcggtc ttgtatggtt cctccacagt ttttctccat	14040
aatcttgaag aggccaaaac attagctta tccaaaggacc aaataggcaa tggggctca	14100
tgttgttaggg ccatgaaagc ggccattttt gtgattctt gcacttctgg aacgggttat	14160
tgttcactat cccaagcgac accatcacca tcgtttccct ttcttctacc aaagtaata	14220
cctcccaacta attctctaac aacaacgaag tcagttaccc ttgttgcgtt 14280	
ggagataagt ctaaaagaga gtcggatgca aagttacatg gtcttaagtt ggcgtacaat	14340
tgaagttctt tacggatttt tagtaaacct tggcgttc taacactacc ggtaccccat	14400
tttaggaccac ccacagcacc taacaaaacg gcatcagcct tcttggaggc ttccagcgc	14460

tcatctggaa gtggAACACC ttagcatcg atagcagcac caccaattaa atgatttcg	14520
aaatcgaaact tgacattgga acgaacatca gaaatagctt taagaacctt aatggctcg	14580
gctgtgattt ctgaccaac gtggcacct ggcaaaacga cgatcttctt agggcagac	14640
attacaatgg tataccttg aaatataat aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	14700
tgcaGCTtct caatgatatt cgaatacgt ttgaggagat acagccta atccgacaaa	14760
ctgtttaca gattacgt cgtacttgg acccatcatt gaatttgaa catccgaacc	14820
tgggagttt ccctgaaaca gatagtataat ttgaacctgt ataataat atagtctagc	14880
gctttacgga agacaatgta tgtatttcgg ttccctggaga aactattgca tctattgcat	14940
aggttaatctt gcacgtcgca tccccgggtc atttctgcg ttccatctt gcactcaat	15000
agcatatctt tggtaacgaa gcatctgtgc ttcatttgt agaacaaaaa tgcaacgcga	15060
gagcgttaat ttccaaaca aagaatctga gtcgtttt tacagaacag aaatgcaacg	15120
cgaaggcgt atttaccaa cgaagaatct gtgcatttattttgtaaaac aaaaatgcaa	15180
cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc attttacag aacagaaatg	15240
caacgcgaga gcgcgtatcc accaacaag aatctatact tctttttgt tctacaaaaa	15300
tgcattccgaa gagcgttattt ttctaaaca agcatcttag attactttt ttctcccttg	15360
tgcgtctat aatgcagtct cttgataact tttgcactg taggtccggt aaggtagaa	15420
gaaggctact ttgggtctta tttctcttc cataaaaaaa gcctgactcc acttcccgcg	15480
tttactgtt actagcgaag ctgcgggtgc atttttcaa gataaaggca tccccgatta	15540
tattctatac cgatgtggat tgcgcaact ttgtaaacag aaagtgtatcg cggtgtat	15600
tcttcattgg tcagaaaattt atgaacggtt tcttctattt tgtctctata tactacgtat	15660
aggaaatgtt tacattttcg tatttttc gattcactct atgaatagtt cttaactacaa	15720
ttttttgtc taaagagtaa tactagagat aaacataaaa aatgttaggg tcgagtttag	15780
atgcaagggtc aaggaggcgaa aggtggatgg gtaggtata tagggatata gcacagagat	15840
atatacgaaa gagatacttt tggcaatgt ttgtggaaac ggtattcgca atattttagt	15900
agctcggttac agtccgggtgc gttttgggtt ttttggaaatgt ggcgtttcag agcgctttg	15960
gtttcaaaa gcgcgtgaa gttcctatac ttcttagaga ataggaactt cggaatagga	16020
acttcaaaagc gttccgaaa acgagcgctt ccgaaaatgc aacgcgagct ggcacatac	16080
agctcactgt tcacgtcgca cctatatcg cgtgttgccgtatataat atacatgaga	16140
agaacggcat agtgcgtgtt tatgcttaaa tgcgtactta tatgcgtcta ttatgttagg	16200
atgaaaggta gtcttagtacc tcctgtgata ttatccatt ccatgcgggg tattgtatgc	16260
ttccttcagc actaccctt agctgttcta tatgctgcca ctctcaatt ggattgtct	16320

catccttcaa tgctatcatt tccttgata ttggatcata tgcatagta c gagaaacta	16380
gaggatc	16387
<210> 49	
<211> 448	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 49	
cccatttaccg acatttggc gctatacgtg catatgtca tgtatgtatc tgtat taaa	60
acacttttgt attat tttc ctcataatag tgtatagg ttatacgatg atttaattat	120
tacttacca cccttattt caggctgata tcttagcctt gttactagtt agaaaaagac	180
attttgctg tcagtcactg tcaagagatt ctttgctgg cattttctt agaagcaaaa	240
agagcgatgc gtctttccg ctgaaccgtt ccagcaaaaa agactaccaa cgcaatatgg	300
attgtcagaa tcatataaaa gagaagcaaa taactcctg tcttgtatca attgcattat	360
aatatcttct tggtagtgca atatcatata gaagtcatcg aaatagatata taagaaaaac	420
aaactgtaca atcaatcaat caatcatc	448
<210> 50	
<211> 250	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 50	
ccgcaaatta aagcttcga gcgtccaaa accttctcaa gcaaggttt cagtataatg	60
ttacatgcgt acacgcgtct gtacagaaaa aaaagaaaaa tttgaaatata aaataacgtt	120
cttaataacta acataactat aaaaaataa atagggacct agacttcagg ttgtctaact	180
ccttccttt cggttagagc ggatgtgggg ggagggcgtg aatgttaagcg tgacataact	240
aattacatga	250
<210> 51	
<211> 1181	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 51	
taaaacctct agtggatgat tagatgtat caatgaagcg gaagcaaaaa gaccagatg	60
gaggcctata gaagaaactg cgatacctt tgtatggct aaacaaacag acatctttt	120

atatgtttt acttctgtat atcgtgaagt agtaagtgtat aagcgaattt ggctaagaac	180
gtttaagt aacaaggac ctctttgcc tttcaaaaaa ggattaaatg gagttaatca	240
tttagattta gtttcgtta gattctgtat ccctaaataa ctcccttacc cgacggaaag	300
gcacaaaaga ctgtataat agcaaacggc cagtagccaa gaccaataa tactagagtt	360
aactgtatgtt cttaaacagg cattacgtgg tgaactccaa gaccaataa caaaatatcg	420
ataagttatt ctggccacc aatttaagga gcctacatca ggacagtagt accattcctc	480
agagaagagg tatacataac aagaaaatcg cgtgaacacc ttatataact tagccgtta	540
tttagagctaa aaaccttgca aaatttccta tgaataagaa tacttcagac gtgataaaaa	600
tttactttct aactttctc acgctgcccc tatctgttct tccgctctac cgtgagaat	660
aaagcatcga gtacggcagt tcgctgtcac tgaactaaaa caataaggct agttcgaatg	720
atgaacttgc ttgctgtcaa acttctgagt tgccgctgat gtgacactgt gacaataat	780
tcaaacccgtt tatacggtc tcctccggta ccgggtctgc caccctcaat agagctcagt	840
aggagtcaga acctctgcgg tggctgtcag tgactcatcc gctttcgta agttgtgcgc	900
gtgcacattt cggccgttcc cgctcattt gcagcaggcg gaaatttca tcacgctgtat	960
ggacgcaaaa aaaaataat taatcgtaa agaatcttgg aaaaaaaattt gaaaaatttt	1020
gtataaaaagg gatgaccaa cttgactcaa tggctttac acccagtatt ttcccttcc	1080
ttgtttgtta caattataga agcaagacaa aaacatatacg acaacccattt cctaggagtt	1140
atattttttt accctaccag caatataagt aaaaaacttagt t	1181
<210> 52	
<211> 759	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 52	
ggccctgcag gcctatcaag tgctggaaac tttttctttt ggaatttttg caacatcaag	60
tcatagtcaa ttgaatttgc ccaatttcac atttaagatt tttttttttt catccgacat	120
acatctgtac actaggaagc cctgttttc tgaaggagct tcaaataat atattttta	180
catattttt atgattcaat gaacaatcta attaaatcgaa aaacaagaac cgaaacgcga	240
ataaataatt tattttagatg gtgacaagtg tataagtctt catgggaca gctacgattt	300
ctctttcggt ttggctgag ctactgggtt ctgtgacgca gggcatttgc cgccgcgtta	360
ttagctaccc tcgtggcctg aaagatggcg ggaataaagc ggaactaaaa attactgact	420
gagccatatt gaggtcaatt tgtcaactcg tcaagtacg tttgggtggac ggcccttcc	480

caacgaatcg tatatactaa catgcgcgcg cttcctatat acacatatac atatatatat	540
atatatatat gtgtcggtgt atgtgtacac ctgtatttaa tttccttact cgccgggttt	600
tctttttctt caattcttgg cttcctttt ctcgagtata taattttca ggtaaaattt	660
agtacgatag taaaatactt ctcgaactcg tcacatatac gtgtacataa tgtctgaacc	720
agctcaaaag aaacaaaagg ttgctaaca ctctctaga	759
<210> 53	
<211> 643	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 53	
gaaatgaata acaatactga cagttactaaa taattgccta cttggcttca catacggtgc	60
atacgatcgat atagataata atgataatga cagcaggatt atcgtaatac gtaatagttg	120
aaaatctcaa aatgtgtgg gtcattacgt aaataatgtat aggaatggaa ttcttctatt	180
tttcctttt ccattcttagc agccgtcgaa aaaacgtggc atcctctt tcgggctcaa	240
ttggagtcac gctgccgtga gcattcttc tttccatatac taacaactga gcacgttaacc	300
aatggaaaag catgagctta gctgtgtcc aaaaaagttat tggatggta ataccatttg	360
tctgttctct tctgactttg actcctcaaa aaaaaaaaaat ctacaatcaa cagatcgctt	420
caattacgcc ctccacaaaaa ctttttcct tcttctcgc ccacgttaaa ttttatccct	480
catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga cataataactt	540
ctctatcaat ttcatgttattt gttttccctt gctgttattct tctgttcttc tttttctttt	600
gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaatct aga	643
<210> 54	
<211> 270	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<400> 54	
gacctcgagt catgtatgtac gcttacatc acggccccc cccacatccg	60
ctcttaaccga aaaggaagga gttagacaac ctgttttttta ggtccctatt tattttttta	120
tagttatgtt agtattaaaga acgttattta tatttcaat tttttttttt tttctgtaca	180
gacgcgtgtaa cgcgtgtaaac attatactga aaaccttgct tgagaagggtt ttgggacgct	240
cgaaggctt aatttgcggc cggtacccaa	270
<210> 55	

<211> 15539

<212> DNA

<213>

> artificial sequence

<220><223> constructed plasmid

<400> 55

tcgcgcgtt cgggtatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta	60
cagcttgct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg ctttaactatg cggcatcaga gcagattgtt ctgagagtgc	180
accataaatt cccgtttaa gagcttggtg agcgcttagga gtcactgcca ggtatcgtt	240
gaacacggca ttagtcaggg aagtctataac acagtcctt cccgcaattt tcttttcta	300
ttacttttgg cctctcttag tacactctat attttttat gcctcgtaa tgattttcat	360
ttttttttt ccacctagcg gatgactctt ttttttctt agcgatggc attatcacat	420
aatgaattat acattatata aagtaatgtt atttttcgaa agaatatact aaaaaatgag	480
caggcaagat aaacgaaggc aaagatgaca gagcagaaag ccctagtaaa gcgtattaca	540
aatgaaacca agattcagat tgcgatctt ttaaagggtg gtcccttagc gatagagcac	600
tcgatcttcc cagaaaaaga ggcagaagca gtagcagaac agggccacaca atcgcaagtg	660
attaaacgtcc acacaggtat agggtttctg gaccatatga tacatgtct ggccaagcat	720
tccggcttgtt cgctaattcg ttagtgcatt ggtgacttac acatagacga ccatcacacc	780
actgaagact gcggttgc tctcgtaa gctttaaag aggcctagg gcccgtgcgt	840
ggagtaaaaa ggttggatc aggatttgcg ctttggatg aggcacttc cagagcggtg	900
gtagatctt cgaacaggcc gtacgcgtt gtcgaacttg gtttgcggaa ggagaaagta	960
ggagatctt cttgcgagat gatccgcatttttgcgatggaa gcttgcaga ggctagcaga	1020
attaccctcc acgttggattt tctgcgaggc aagaatgtt atcaccgtt tgagagtgcg	1080
ttcaaggctc ttgcgggtgc cataagagaa gccacctcgc ccaatggtaa caacgttgc	1140
ccctccacca aagggtttct tatgtgttga caccgattat ttaaagctgc agcatacgt	1200
atatacatat gtatcacat gaatgtcagt aagtatgtt acgaacagta	1260
tgtatcttgc ttcttttgc tttttttttt ttcttctt gaaactcgacg gatctatgcg	1320
gtgtgaaata ccgcacagat gcttaaggag aaaataccgc atcaggaaat tgtaagcg	1380
aatatttgt taaaattcgc gttaaatttt tttttttttt taaccaatag	1440
gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt	1500
	1560

gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga	1620
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatac aagtttttg	1680
gggtcgaggt gccgttaaagc actaaatcg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct	1740
tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggaa agaaagcgaa aggagcgggc	1800
gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgtt	1860
aatgcgcgc tacagggcgc gtccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaaggc	1920
gcggtgccgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag gggatgtgc tgcaaggcga	1980
ttaagttggg taacgccagg gtttcccg tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagttag	2040
cgcgcgtaat acgactcaat atagggcgaa ttgggtaccg ggcccccct cgaggtcgac	2100
ggcgcgccac tggtagagag cgactttgtt tgcccaatt gcgaaaccccg cgatatcctt	2160
ctcgattctt tagtacccga ccaggacaag gaaaaggagg tcgaaacgtt tttgaagaaa	2220
caagaggaac tacacggaag ctctaaagat ggcaaccagc cagaaactaa gaaaatgaag	2280
ttgatggatc caactggcac cgctggctt aacaacaata ccagccttcc aacttctgtt	2340
aataacggcg gtacgcccagt gccaccagta ccgttacctt tcggtataacc tccttcccc	2400
atgtttccaa tgcccttcat gcctccaacg gctactatca caaatcctca tcaagctgac	2460
gcaagcccta agaaatgaat aacaatactg acagtactaa ataattgcct acttggcttc	2520
acatacgttt catacgtcga tatagataat aatgataatg acagcaggat tatcgtaata	2580
cgtaatagct gaaaatctca aaaatgtgtg ggtcattacg taaataatga taggaatggg	2640
attttcttat tttcccttt tccattcttag cagccgtcg gaaaacgtgg catcctctt	2700
ttcgggctca attggagtca cgctgccgtg agcatcctt cttccatata ctaacaactg	2760
agcacgtaac caatggaaaa gcatgagctt agcggtgctc caaaaaagta ttggatggtt	2820
aataccattt gtctgttctc ttctgacttt gactcctcaa aaaaaaaaaat ctacaatcaa	2880
cagatcgctt caattacgcc ctcacaaaaa ctttttcct tttcttcgc ccacgttaaa	2940
ttttatccct catgttgtct aacggatttgcacttgat ttattataaa aagacaaaga	3000
cataataactt ctctatcaat ttctgttatt gttttccctt gcgttattct tctgttctt	3060
ttttctttt gtcataatata accataacca agtaatacat attcaaacta gtatgactga	3120
aaaaaaaaact cttaaagact taagaaatcg tagttctgtt tacgattcaa tggttaatc	3180
acctaatacggttgc gtcactgg tgcactggat gaagacttgg aaaaaacccat	3240
cgtcggtgtc attcaactt gggctgaaaa cacacccgtt aatatccact tacatgactt	3300

tggttaacta gccaaagtgc gtgttaagga agctgggtct tggccagttc agttcgaaac	3360
aatcacggtt tctgatggaa tcgccatggg aacccaagga atgcgttct cctgacatc	3420
tcgtgatatt attgcagatt ctattgaagc agccatggg ggtcataatg cgatgctt	3480
tgttagccatt ggcgggttgtg ataaaaacat gcccggttct gtatcgcta tggctaacat	3540
ggatatccca gccattttg cttacggcgg aacaattgca cctggtaatt tagacggcaa	3600
agatatcgat ttagtctctg tcttgaagg tgcggccat tggaccacg gcgatatgac	3660
caaagaagaa gttaaagctt tggaatgtaa tgcttgccc ggtcctggag gtcgcgtgg	3720
tatgtatact gctaacaacaa tggcgacagc tattgaagtt ttggactta gcctccggg	3780
ttcatcttct caccggctg aatccgcaga aaagaagca gatattgaag aagctggcg	3840
cgctgttgc aaaatgctcg aatgggctt aaaaccttct gacattttaa cgctgtaa	3900
tttgaagat gctattactg taactatggc tctggaggt tcaaccaact caacccttca	3960
cctcttagct attgcccatt ctgctaatgt ggaattgaca ctgtatgatt tcaatacttt	4020
ccaagaaaaa gttcctcatt tggctgattt gaaaccttct ggtcaatatg tattccaaga	4080
ccttacaag gtcggagggg taccagcagt tatgaaatat ctccaaaa atggcttcct	4140
tcatggtgac cgtatcaattt gtactggcaa aacagtcgct gaaaatttga aggctttga	4200
tgattnaaca cctggtaaaa aggttattat gccgcttgaa aatcctaaac gtgaagatgg	4260
tccgctcattt attctccatg gtaacttggc tccagacggt gccgttgc aagtttctgg	4320
tgtaaaagtgcgtcgatg tggctctgc taaggctttt aattctgaag aagaagccat	4380
tgaagctgcttgaatgtatgat atattgttga tggtgatgtt gttgtcgatc gttttgttagg	4440
accaaaggcggc ggtcctggta tgcctgaaat gcttccctt tcatcaatga ttgttggtaa	4500
aggcaaggtt gaaaaagttt ccctctgac agatggccgc ttctcagggt gtaacttatgg	4560
tcttgcgtg ggtcatatcg ctcctgaagc acaagatggc ggtccaatcg cctacctgca	4620
aacaggagac atatgcacta ttgaccaaga cactaaggaa ttacacttig atatctccga	4680
tgaagagttt aaacatcgatc aagagaccat tgaattgcca ccgctctatt cacgcgtat	4740
ccttggtaaa tatgtcaca tcggttcgtc tgcttctagg ggagccgtaa cagacttttgc	4800
gaagcctgaa gaaactggca aaaaatgttgc tccctggttgc tgggttaag cggccgcgtt	4860
aattcaaaattt aattgtatata gtttttaat ggttattgaa tctgtttaga aataatggaa	4920
tattatattttt atttattttt ttatattttt ggtcggctct tttctctga aggtcaatga	4980
caaaatgata tgaaggaaat aatgatttct aaaatttac aacgtaaatgat attttacaa	5040
aagccttagct catttttgtt catgcactat ttactcactg ctgaaatattt acggccagtc	5100
cactgcggag tcatttcaaa gtcattctaa tcgatctatc gttttgata gtcattttg	5160

gagttcgca ttgtttctg ttattcacaa ctgtttaat ttttatttca ttctggaact	5220
cttcgagttc ttgttaagt ctccatagt agcttacttt atccccaac atatttaact	5280
tcatgtcaat ttccgtctt aaattttcca catcatcaag ttcaacatca tcttttaact	5340
tgaatttattt ctctagctt tccaaccaag cctcattgct ccttgatttta ctggtgaaaa	5400
gtgatacact ttgcgcgcaa tccaggtcaa aactttctg caaagaattc accaattct	5460
cgacatcata gtacaatttgc ttttgcctc ccatcacaat ttaatatacc tgatggattc	5520
ttatgaagcg ctggtaatg gacgtgtcac tctacttcgc cttttccct actccctta	5580
gtacggaaga caatgctaattt aataagagg gtaataataa tattataat cggcaaaaaaa	5640
gattaaacgc caagcgtttta attatcagaa agcaaacgtc gtaccaatcc ttgaatgtt	5700
cccaattgttta tattaaagagt catcacagca acatattctt gttattaaat taattattat	5760
tgttttgc tattgtataa aaaaacccaa tatgtataaa aaaagtgaaat aaaaatacc	5820
aagtatggag aaatatatta gaagtctata cgtaaacca cccggggccc ccctcgaggt	5880
cgacggatc gataagcttgc atatcgaaattt cctgcagccc ggggatcca ctatgttgc	5940
agcggccgt cttagaacttag taccacagggt gttgcctct gaggacataa aatacacacc	6000
gagattcatc aactcattgc tggagttgc atatctacaa ttgggtgaaa tggggagcga	6060
tttgcaggca ttgcgtggc atgcccgttag aggtgtggc aataagagcg acctcatgt	6120
atacctgaga aagcaacctg acctacagga aagagttact caagaataag aatttcgtt	6180
ttaaaaccta agatcactt taaaattttgt atacacttat ttttttata acttattaa	6240
taataaaaat cataaatcat aagaaattcg ctactcttta attaatcaaa aagttaaaat	6300
tgtacgaata gattcaccac ttcttaacaa atcaaaccct tcattgattt tctcgaaatgg	6360
caatacatgt gtaattaaag gatcaagagg aaacttcttc gccataaagt cggcaacaag	6420
ttttggaaca ctatccttc tcttaaaacc gccaaatataa gctcccttcc atgtacgacc	6480
gcttagcaac agcataggat tcatcgacaa attttgaa tcaggaggaa cacctacgat	6540
caacactgact ccatatgcctt cttgacagca ggacaacgcg gttaccatag tatcaagacg	6600
gcctataact tcaaaagaga aatcaactcc accgtttgac atttcgtttaa ggacttcttgc	6660
tattggtttc ttataatctt gagggtaac acattcagta gccccgaccc ctttagctt	6720
tgcaaatttg tccttatttgc tgcgttacacc tataatccctc gctgcgcctg cagcttaca	6780
ccccataata acgtttagtc ctactcctcc taaaccgaat actgcacaag tcgaaccctg	6840
tgttaacctt gcaactttaa ctgcggacc gtaaccgggt gaaaatccgc accctatcaa	6900
gcaaaactttt tccagtggtt gaaatgttgc gatgttgc acagatatct cgtccaccac	6960
tgtgtattgg gaaaatgttgc aagtaccaag gaaatgggtt ataggtttcc ctctgcgt	7020

aaatctgctt gtaccatcct gcatagtacc tctaggcata gacaaatcat ttttaaggca	7080
gaaattaccc tcaggatgtt tgcagactct acacttacca cattgaggag tgaacagtgg	7140
gatcacttta tcaccaggac gaacagtggt aacacccca cctatggatt caacgattcc	7200
ggcagcctcg tgcgtccgca ttactggca aggagtaact agagtccac tcaccacatg	7260
gtcgtcgat ctacaggatc cgggtggcaac catcttgatt ctaacctcggt gtcgtttgg	7320
tggcgctact tctacttctt ctatgctaaa cggcttttc tcttcccaca aaactgccgc	7380
tttacactta ataactttac cggctgttga catcctcagc tagtattgt aatatgtgt	7440
tttggggaa ttatataagaa gaataattac aaaaaaaatt acaaaggaaag gtaattacaa	7500
cagaattaag aaaggacaag aaggaggaag agaatcgtt cattatttct tctttgttat	7560
ataacaacc caagtagcga ttggccata cattaaaagt tgagaaccac cctccctggc	7620
aacagccaca actcggttacc attgttcatc acgtatcatga aactcgctgt cagctgaaat	7680
ttcacccctc tggatctctc ttttattct tcatacggttcc actaaccctt ttccatcagc	7740
tggcaggaa cggaaagtgg aatcccattt agcgagcttc ctctttctt caagaaaaga	7800
cgaagcttgt gtgtgggtgc ggcgcgttagt atcttccac attaagaaat ataccataaa	7860
gttacttag acatcactat ggctatataat atatataat atatatgtaa cttagcacca	7920
tcgcgcgtgc atactgcat gtgttaaccg aaaagttgg cgaacacttc accgacacgg	7980
tcatttagat ctgtcgctcg cattgcacgt cccttagcct taaatcttag gcgggagcat	8040
tctcggtaa ttgtgcagcc tgcgttagcaa ctcaacatag cgtatctac ccagttttc	8100
aagggttat cgttagaaga ttctccctt tcttcctgct cacaatctt aaagtcatc	8160
attgcacgac taaatgcaag catgcggatc ccccggtcg caggaattcg atatcaagct	8220
tatcgatacc gtcgactggc catatactt tcccatatata gattcgcca agccatgaaa	8280
gttcaagaaa ggtctttaga cgaattaccc ttcatctc aaactggcgt caagggatcc	8340
tggtatggtt ttatcgaaaa atttctggtt ctatagcat cgttttggac ttctctgttc	8400
ccattaggcg gttcaggagc cagcgcagaa tcatttttg aaggatactt atccttcca	8460
attttgattt tctgttacgt tggacataaa ctgtatacta gaaattggac tttgtatggtg	8520
aaactagaag atatggatct tgataccggc agaaaacaag tagatttgac tcttcgttagg	8580
gaagaaaatga ggattgagcg agaaacattt gcaaaaagat cttcgtaac aagatttta	8640
catttcgtgtt gttttttttt cttccacgt ccgcggaaat ctgtgtatata tactgcatct	8700
ttttgttatac taatttttt cttccacgt ccgcggaaat ctgtgtatata tactgcatct	8760

agatatatgt tatcttatct tggcgctac attaatttt caacgtattc tataagaat	8820
tgcgggagtt ttttcatgt agatgatact gactgcacgc aaatataggc atgatttata	8880
ggcatgattt gatggctgta ccgataggaa cgctaagagt aacttcagaa tcgttatct	8940
ggcggaaaaaa attcatttgt aaactttaaa aaaaaaagcc aatatccccaaatttattaa	9000
gagcgccctcc attattaact aaaatttcac tcagcatcca caatgtatca ggtatctact	9060
acagatattt catgtggcga aaaagacaag aacaatgcaa tagcgcata agaaaaaaca	9120
caaagcttca aatcaatgaa tcgaaaatgt cataaaataa gtatataat tgaaactaag	9180
tcataaagct ataaaaagaa aatttattta aatgcaagat ttaaagtaaa ttacacggccc	9240
tgcaggccctc agctcttggtt ttgttctgca aataacttac ccattttttt caaaacttta	9300
ggtcacccct cctttgttag aataagttct atccaataca tcctatttgg atctgcttga	9360
gcttcttca tcacggatac gaattcattt tctgttctca caattttggcacaactctg	9420
tcttcgttgc ccccgaaact ttctggcagt tttgagtaat tccacatagg aatgtcat	9480
taactctgt tcggaccatg aatttccctc tcaaccgtgt aaccatcgaa attaatgata	9540
aagcagatgtt ggttatctt ctctctaattt gctagtccta attttggac agtcagttgc	9600
aatgatccat ctccgataaa caataatgt cttagattctt tatctgcaat ttggctgcct	9660
agagctgcgg ggaaagtgtt tcctatagat ccccaacaagg gttgaccaat aaaatgtgat	9720
ttcgatttca gaaatataaga tgaggcacgg aagaaagaag tgccttggc agccacgatc	9780
gtctcatttttca tttgggtcaa atttcgaca gtttgcaca gtctatcttgcgacaaacagc	9840
gcgtttagaaag gtacaaaatc ttcttgctttt ttatctatgt acttgcctt atattcaatt	9900
tcggacaatgtt caagaagaga tgatatcagg gattcgaatgtt cgaaatttttgcatttttgc	9960
ttgaaaatttt taccttcatc gataattcaag gaaatcattt tattttcattt aagatggta	10020
gttaaatgcac ccgtactaga atcgttacgg tttacaccca acataagaat aaaatcagca	10080
gattccacaa attccttcaa gtttggctct gacagagtac cggtgttaat ccccaaaaat	10140
gaggcataatg cttcatcaac agatgatttca ccaaagttca aagtagtaat aggtacttta	10200
gtctttgaaa taaacttgatg aacagtcttc tctaggccga acgtatataat ttcatggcct	10260
gtgattacaa ttggtttctt ggcatttttc agactttctt gtatttttttt cagaatctt	10320
tgtatcgtt tattcgtatgtt ggaattttcc ttcttaagag gcaaggatgg ttttcagcc	10380
tttagcggcag ctacatctac aggttttttttgcattttc cttagtaa	10440
gcagacaaca ctctatcaat ttcaacagtt gcattctcggtt ctgtcaataa agtccctggca	10500
gcagtaaccg gttcgttgcatttccatcaag tgcttggaaat caccatcgcgcaacgtatgg	10560
tgaacaaact taccttcgtt ctgcacttgcgat gaggttggatgg atcccaacat ctcacacaaca	10620

ggcaggtct cagcatagga gcccgctaag ccattaactg cggataattc gccaacacca	10680
aatgtgtca agaatgccgc agccttttc gttctgcgt accgctggc catataggag	10740
gcatttaact cattagcatt tcccacccat ttcatatctt tgtgtgaaat aatttgatct	10800
agaaatigca aaitgtagtc acctggtaact cgaaatattt cttctataacc taattcggt	10860
aatctgtcca acagatagtc acctactgta tacatttgt ttactagttt atgtgtgttt	10920
attcgaaact aagttcttgg tgttttaaaa ctaaaaaaaa gactaactat aaaagttagaa	10980
ttaagaagt ttaagaata gatttacaga attacaatca atacctaccg tctttatata	11040
cttattagtc aagttagggaa ataatttcag ggaactggtt tcaacctttt tttcagtt	11100
tttccaaatc agagagagca gaaggtataa gaaggtaaa gaaaatgaga tagatacatg	11160
cgtgggtcaa ttgccttgtg tcatcatta ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg	11220
ttgtgccgt ttttgcctg ttgtgcccc tgttctgt agttgcgcta agagaatgga	11280
cctatgaact gatgggttgtt gaagaaaaca atattttgtt gctgggattc ttttttttc	11340
tggatgccag cttaaaagc gggctccatt atatttagt gatgccagga ataaactgtt	11400
caccagaca cctacgatgt tatataattt gtgttaaccgg cccctattt tggcatgtt	11460
cgggtacag cagaattaaa aggctaattt ttgactaaa taaagttagg aaaatcacta	11520
ctattaatta ttacgtatt cttgaaatg gcagtatttga taatgataaa ctcgaactga	11580
aaaagcgtgt ttttattca aaatgattct aactccctt cgtaatcaag gaatctttt	11640
gccttggcct ccgcgtcatt aaacttcttg ttgtgacgc taacattcaa cgctagtata	11700
tattcgttt ttccaggtaa gttctttca acgggtctta ctgatgaggc agtcgcgtct	11760
gaaccctgtta agaggtaaaa tatgtcttct tgaccgtacg tgtcttgcatt gttattagct	11820
ttggaaattt gcatcaagtc ataggaaaat tttaatctt gctctttgg gctcaagggt	11880
acaaggctt cggaaatagg ggcggccca ccgcgggtt gctccagctt ttgtccctt	11940
tagtgagggt taattgcgcg ctggcgtaa tcatggtcat agctgttcc tgtgtgaaat	12000
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg	12060
ggtcctaat gagtgagctt actcacattt attgcgttgc gctcaactgcc cgctttccag	12120
tcggaaacc tgcgtgcca gtcgtttaa tgaatcgccc aacgcgcggg gagaggcggt	12180
ttgcgtattt ggcgttcc cgttccctcg ctcaactgact cgctgcgtc ggtcggttgc	12240
ctgcggcgag cggatcagc tcaactaaag gcgtaatac gttatccac agaatcagg	12300
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa agggcaggaa cgtaaaaag	12360
gccgcgttgc tggcgcccc ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga	12420
cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gttccccct	12480

ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc	12540
tttccctt cggaagcgt ggcccttct catagctcac gctgttagta tctcagttcg	12600
gtgttagtcg ttgcgtccaa gctggctgt gtgcacgaac ccccggtca gcccgaccgc	12660
tgcgccttat ccggtaacta tcgtctttag tccaaacccgg taagacacga cttatcgcca	12720
ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag	12780
ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgt	12840
ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	12900
accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga	12960
tctcaagaag atccttgat ctttctacg gggctgacg cttagtgaa cgaaaaactca	13020
cgttaaggga tttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat cctttaat	13080
taaaaaatgaa gtttaatc aatctaaatg atatatgagt aaacttggc tgacagttac	13140
caatgcttaa tcagtggagc acctatctca gcgatctgc tatttcgttc atccatagtt	13200
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacggagg gcttaccatc tggccccagt	13260
gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca cggctccag atttatcagc aataaaccag	13320
ccagccggaa gggcgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtct	13380
attaattgtt gccggaaagc tagagtaagt agttgccag ttaatagtt gcgcaacgtt	13440
gttgcatttgc tciacaggcat cgtgggtca cgctcgctgt ttggatggc ttcatcagc	13500
tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tggatggcaaa aaaagcggtt	13560
agctccctcg gtcctccgat cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg	13620
gttatggcag cactgcataa ttcttact gtcattgcattt ccgtaaatgt ctgttgcgt	13680
actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtt tgccggacc gagttgtct	13740
tgcggcggtt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgcgtatc	13800
attggaaaac gttttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt	13860
tcgatgtaac ccactcggtc acccaactga tctttagcat ctttacttt caccagcggtt	13920
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gcccggaaaa aggaaataag ggcgacacgg	13980
aaatgttcaa tactcataact cttccctttt caatattttt gaagcatttgc ttaggttat	14040
tgtctcatga gcgatcatat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg	14100
cgcacatttc cccggaaaatg gccacgtaa cgaaggatct gtgtttcatt ttgttagaaca	14160
aaaatgcaac gcgagagcgc taattttca aacaaagaat ctgagctgca tttttacaga	14220

acagaaatgc aacgcgaaag cgctattta ccaacgaaga atctgtgctt cattttgtat	14280
aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt tttcaaacaa agaatctgag ctgcatttt	14340
acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta ttttaccaac aaagaatcta tacttcttt	14400
ttgttctaca aaaatgcac ccgagagcgc tatTTTcta acaaagcatc tttagattact	14460
tttttctcc ttgtgcgt ctataatgca gtctttgtat aacttttgc actgttaggtc	14520
cgttaagggtt agaagaaggc tactttggtg tctattttctt cttccataaaa aaaaggctga	14580
ctccacttcc cgcgttact gattactagc gaagctgcgg gtgcatttt tcaagataaaa	14640

ggcatccccg attatattct ataccgatgt ggattgcgc aactttgtga acagaaagtgc	14700
atagcgttga tgattcttca ttggtcaga aattatgaac gttttttctt attttgtctc	14760
tatatactac gtataggaaa tgTTTACATT ttctgtattgt ttgcattca ctctatgaat	14820
agttcttact acaattttt tgcataaaga gtaataactag agataaaacat aaaaaatgtat	14880
gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag cgaaagggtgg atggtaggt tatataggga	14940
tatagcacag agatataatag caaagagata cttttgagca atgtttgtgg aagcggtatt	15000
cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg gtgcgtttt gttttttga aagtgcgtct	15060

tcagagcgct ttgggtttc aaaagcgctc tgaagttcct atacttcta gagaataggat	15120
acttcggaat aggaacttca aagcgTTTCC gaaaacgagc gttccgaaa atgcacgcg	15180
agctgcccac atacagctca ctgttacgt cgcacctata tctgcgtgtt gcctgtatata	15240
atatacat gagaagaacg gcatagtgcg tgTTTATGCT taaatgcgtat cttatatgcg	15300
tctatTTATG taggatgaaa ggtgtctgt tacctctgtt gatattatcc cattccatgc	15360
gggttatcgt atgttcctt cagcaactacc cttagctgt tctatatgcg gccactcctc	15420
aattggatta gtctcatct tcaatgctat catttcctt gatattggat catactaaga	15480

aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc ccttcgtc	15539
---	-------

<210> 56

<211> 1125

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> horse ADH coding region codon optimized for S. cerevisiae

expression

<400> 56

atgtcaacag ccgttaaagt tattaagtgt aaagcggcag tttgtggga agagaaaaag	60
ccgttagca tagaagaagt agaagttagcg ccacaaaaag cacacgaggt tagaatcaag	120
atggttgcca ccgaaatctg tagatccgac gaccatgtgg tgagtggcac tctagttact	180

ccttgccag taatcgccgg acacgaggct gccggaatcg ttgaatccat aggtgaaggt 240

gttaccactg ttgcgtctgg tgataaagt atcccactgt tcactcctca atgtggtaag 300
 tgttagatct gcaaacatcc tgaggtaat ttctgcctta aaaaatgattt gtctatgcct 360
 agaggtacta tgcaggatgg tacaaggcaga tttacatgca gaggaaacc tatacaccat 420
 ttccctggta ctctacatt ttcccaatac acagtgggg acgagatatac tgtcgctaaa 480
 atcgatgcag ctccaccact gaaaaaagt tgcttgatag ggtgcggatt ttccaccgg 540
 tacggttccg cagttaaagt tgcaaagggtt acacagggtt cgacttgc agtattcggt 600
 ttaggaggag taggactaag cgttattatg gggtgtaaag ctgcaggcgc agcgaggatt 660

ataggtgttag acatcaataa ggacaaattt gcaaaagcta aggaggtcgg ggctactgaa 720
 tgggttaacc ctcaagatta taagaaacca atacaagaag tcctactga aatgtcaac 780
 ggtggagttt atttctttt tgaagttata ggccgtctt atactatggt aactgcgttg 840
 tcctgctgtc aagaggcata tggagtcaatgt gatcgtag gtgttcctcc tgattcaca 900
 aatttgtcga tgaatcctat gctgttgctaa agcggcgtca catggaaggg agctatattt 960
 ggcggttta agagcaagga tagtggccaaacttggccgactttt ggcgaagaag 1020
 tttgctttt atccttaat tacacatgta ttgccattcg agaaaatcaa tgaagggtt 1080

gatttggtaa gaagtggta atctattcgt acaattttaa ctttt 1125

<210> 57

<211> 375

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 57

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 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

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 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> artificial sequence		
<220><223> constructed plasmid		
<400> 58		
tcgcgcgtt cgggtatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta		60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgc tcagcgggt		120
ttggcgggtg tcgggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc		180
accataccac agctttcaa ttcaattcat cattttttt ttattctttt ttttatttc		240
gttttcttg aaattttttt gattcgtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg		300
agcacagact tagattggta tatatacgca tatgttagtgt tgaagaaaca tgaattgcc		360
cagtattctt aacccaaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt		420
cgaaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatctag tcctgttgct gccaagctat		480
ttaatatcat gcacgaaaag caaacaaact tgtgtgcttc attggatgat cgtaccacca		540
aggaattact ggagtttagtt gaagcattag gtcccaaaat ttgtttacta aaaacacatg		600
tggatatctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg		660
ccaagtacaa tttttactc ttcaagaca gaaaattgc tgacatggta aatacagtca		720
aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac		780
acgggtgttgt gggcccgaggat ttgttagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa		840
aggaacctag aggcctttt atgttagcag aattgtcatg caagggtctcc ctatctactg		900
gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttatcgct		960
ttattgctca aagagacatg ggtgaaagag atgaaggta cgattgggtt attatgacac		1020
ccgggtgtggg tttagatgac aaggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg		1080

atgtggctc tacaggatct gacattatta ttgttggaaaggactattt gcaaaggaa	1140
gggatgctaa ggttaggggt gaacgttaca gaaaaggcagg ctggaaagca tatttgagaa	1200
gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcgtata ctaaactcac	1260
aaatttagagc ttcaatttaa ttatatcgt tattacccta tgcgtgtga aataccgcac	1320
agatgcgtaa ggagaaaata ccgcattcagg aaattgtaaa cgttaatatt ttgttaaaat	1380
tcgcgttaaa ttttggtaa atcagctat ttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa	1440
tccctataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag tgggttcca gtttggaaaca	1500
agagtccact attaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg	1560
gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttgggtcg aggtgccgt	1620
aagcactaaa tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag agcttgcgg ggaaagccgg	1680
cgaacgtggc gagaaggaa ggaaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg ggcgtggcaa	1740
gtgtagcggt cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgc gcttaatgcg ccgcgtacagg	1800
gcgcgtcgcc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgtg ggaaggcga tcggtgcggg	1860
ccttcgcgt attacgccag ctggcgaaag gggatgtgc tgcaggcga ttaagttggg	1920
taacgccagg gtttcccgag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagttag cgccgtaat	1980
acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggcccccct cgaggtcgac tggccattaa	2040
tcttcccat attagatttgc caagccat gaaagtcaa gaaaggctt tagacgaatt	2100
acccttcatt tctcaaactg gctcaaggg atcctggat ggtttatcg ttttattct	2160
ggttcttata gcatcggtt ggacttctt gttccattt ggcgttcag gagccagcgc	2220
agaatcatc ttgttggat acttattcatt tccaattttt attgtctgtt acgttggaca	2280
taaactgtat actagaaatt ggactttgat ggtgaaacta gaagatatgg atcttgatac	2340
cggcagaaaa caagtagatt tgactctcg taggaaagaa atgaggattt agcgagaaac	2400
attagcaaaa agatccttcg taacaagatt ttacatttc tgggttgaa gggaaagata	2460
tgagctatac agcggattt ccatatcaact cagattttgt tatctaattt tttcttccc	2520
acgtccgcgg gaatctgtgt atattactgc atcttagat atgttatctt atcttggcgc	2580
gtacattaa ttcaacgt attctataag aaattgcggg agtttttc atgttagatga	2640
tactgactgc acgcaaatat aggcatgatt tataggcatg attgtatggc tgcgtaccgata	2700
ggaacgctaa gagtaacttc agaatcgta tcctggcga aaaaattcat ttgtaaactt	2760
taaaaaaaaaa agccaatatac cccaaaattt ttaagagcgc ctccattt aactaaaattt	2820

tcactcagca tccacaatgt atcaggtatc tactacagat attacatgtg gcgaaaaaga	2880
caagaacaat gcaatagcgc atcaagaaaa aacacaagc tttcaatcaa tgaatcgaaa	2940
atgtcattaa aatagtatat aaattgaaac taagtataa agctataaaa agaaaattta	3000
tttaaatgca agattnaaag taaattcagc gccctgcagg ccctaaccctg ctaggacaca	3060
acgtcttgc ctggtaaagt ttctagctga cgtgattcct tcacctgtgg atccggcaat	3120
tgtaaagggtt gtgaaaccct cagcttcata accgacacct gcaaatgact ttgcatttt	3180
aacaaagata gttgtatcaa tttcacgttc gaatctatta agttatcga tgttctttaga	3240
ataaatgtag gcggaatgtt ttctattctg ctcaagctatc ttggcgatt taatggcttc	3300
atcaatgtcc ttcaactctaa ctataggca aattggcatc atcaactccg tcataacgaa	3360
cggatggttt gcgttgactt cacaataat acacttaca ttacttggtg actctacatc	3420
tatttcatcc aaaaacagtt tagcgtcattt accaaccac ttcttattaa tgaaatattc	3480
tttagttca ttgttctttt gaagaacaag gtctatcagc ttggatactt ggtttcatt	3540
gataatgacg gcgttggttt tcaacatgtt agagatcaga tcatctgcaa cgtttcaaa	3600
cacgaacact tcttttccg cgataacaagg aagattgttg tcaaacgaac aaccttcaat	3660
aatgcttcg cggcccttct cgatatctgc tgtatcgctc acaataaccg gaggattacc	3720
cgcgccagct ccgatggcct ttttaccaga attaagaagg gttttacca taccgggcc	3780
acccgtaccc cacaacaatt ttatggatgg atgtttgata atagcgtcta aactttccat	3840
agttgggttc ttatagtagt tgacaagggtt ttcaaggcca ccacagctaa ttatggcttt	3900
gtttatcatt tctactgcga aagcgacaca cttttggcg catgggtgac cattaaatac	3960
aactgcattc ccccgagcta tcataccat agaattgcag ataacgggtt ctgttggatt	4020
cgtgcttggaa gttatagcgc cgataactcc gtagggactc attcaacca ctgttagtcc	4080
attatcgccg gaccatgctg ttgttgcag atcttcagtg cctggggat acttggccac	4140
taattcatgt ttcaagattt tatttcata ccttccatg tgggttctt ccaggatcat	4200
tgtggctaag acctctttat tctgtatgc ggctttctt atttcgggtga ttatccatc	4260
tctttgttcc ttgtgttagt gtagggaaag aatctttgt gcatgtactg cagaagaat	4320
ggcattctca acatttcaa atactccaa acatgaagag ttatctttgt aattctttaa	4380
gtttagtggttt tcaccattag ttttcacttt caagtcttg gtgggtggaa ttaaggatc	4440
tttatccatg gtgttggttt atgtgtgttt attcgaaact aagttcttg tgttttaaaa	4500
ctaaaaaaaaa gactaactat aaaagttagaa tttaagaagt ttaagaata gatttacaga	4560
attacaatca atacctaccg tctttatata cttattagtc aagtagggga ataatttcag	4620
ggaactgggtt tcaacctttt tttcagctt tttccaaatc agagagagca gaaggtataa	4680

gaaggtgtaa gaaaatgaga tagatacatg cgtgggtcaa ttgccttgt tcatacattt	4740
ctccaggcag gttgcacac tccattgagg ttgtgcccgt ttttgccctg tttgtgcccc	4800
tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga cctatgaact gatggttgggt gaagaaaaca	4860
atattttgtt gctgggattc ttttttttc tggatgccag cttaaaaagc gggatccatt	4920

atatttagt gatgccagga ataaactgtt caccagaca cctacgtt tataattct	4980
gtgtAACCCG CCCCCTATTG TGGGATGTA CGGGTTACAG CAGAATTTAA AGGCTAATT	5040
TTTGACTAAA TAAAGTTAGG AAAATCACTA CTATTAATTG TTACGTATT CTGGAAATG	5100
GCAGTATTGA TAATGATAAA CTCGAACTGA AAAAGCGTGT TTTTATTCA AAATGATTCT	5160
AACTCCCTTA CGTAATCAAG GAATCTTTT GCCTTGGCT CCAGTCATT AAACCTCTG	5220
TTGTTGACGC TAACATTCAA CGCTAGTATA TATTGTTT TTCAAGGTTA GTTCTTTCA	5280
ACGGGTCTTA CTGATGAGGC AGTCGCGTCT GAACCTGTTA AGAGGTCAAA TATGCTTCT	5340

ctcaactgact cgctgcgctc ggtcggtcg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag	5820
gcccccaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5880
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaaa ccataggctc	5940
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca	6000
ggactataaa gataccaggc gttccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg	6060
acctgcccgc ttaccggata cctgtccgccc tttctccctt cgggaagcgt ggcgcttct	6120
catagctcac gctgttaggta tctcgttgc gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt	6180

gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgccgccttat ccggtaacta tcgtcttgag	6240
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	6300
agagcgaggt atgttaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6360
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6420
gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcgggtgttt ttttgtttgc	6480
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccttgat ctttctacg	6540

gggtctgacg ctcaatggaa cggaaactca cgttaaggga tttggcat gagattatca	6600
aaaaggatct tcacctagat cttttaaat taaaaatgaa gtttaaatc aatctaaagt	6660
atataatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgttta tcagtgaggc acctatctca	6720
gcgtatgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc cgctcggtataactacg	6780
atacgggagg gcttaccatc tggcccgagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca	6840
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccgaa gggccgagcg cagaagtgg	6900
cctgcaactt tattccgcctc catccagtct attaattttt gccggaaagc tagagtaagt	6960
agttcgccag ttaatagttt ggcacacgtt gttccatg ctacaggcat cgtgggtca	7020
cgctcgctgt ttgttatggc ttcattcagc tccggccc aacgatcaag gcgagttaca	7080
tgtatccccca tttttgtcaaa aaaaagggtt agctccctcg gtcctccgtat cgttgtcaga	7140
agtaagttgg ccgcagtgtt atcaatcatg gttatggcag cactgcataa ttcttact	7200
gtcatgccat ccgtaaatgt ctttctgtg actgggtgacttcaacaa gtcattctga	7260
gaatagtgtt tgccggacc gagttgtct tgccggcgtt caatacgga taataccgc	7320
ccacatagca gaacttaaa agtgcacatc attggaaac gttttcggg gcgaaaactc	7380
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcggtc acccaactga	7440
tcttcagcat ctttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat	7500
gccgcaaaaa agggaaataag ggcgacacgg aatgttcaa tactcataact cttccctttt	7560
caatattattt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gggatacat atttgaatgt	7620
attttagaaaa ataaacaaat aggggttcgg cgacatttc cccgaaaagt gcccacgtaa	7680
cgaagcatct gtgttcatt ttgttagaaca aaaatgcaac gcgagagcgc taattttca	7740
aacaaagaat ctgagctgca ttttacaga acagaaatgc aacgcgaaag cgctatattta	7800
ccaacgaaga atctgtgctt cattttgtt aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt	7860
tttcaaaaca agaatctgag ctgcattttt acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta	7920
ttttaccaac aaagaatcta tacttctttt ttgttctaca aaaatgcata ccgagagcgc	7980
tattttctta acaaagcatc ttagattact tttttctcc ttgtgcgtctataatgca	8040
gtctcttgat aacttttgc actgttagtgc cgtaagggtt agaagaaggc tacttggtg	8100
tctatttctt ctccataaa aaaagcctga ctccacttcc cgctttact gattactagc	8160
gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa ggcatccccg attatattct ataccgtatgt	8220
ggattgcgca tactttgtga acagaaatgt atagcgttga tgattttca ttggcagaa	8280

aattatgaac ggtttcttct atttgtctc tatatactac gtataggaaa tgttacatt	8340
ttcgatgtt ttgcattca ctctatgaat agttcttact acaattttt tgtctaaaga	8400
gtaatactag agataaacat aaaaaatgt a gaggcgagt ttagatgcaa gttcaaggag	8460
cgaaaggtagtgg atggtaggt tatataggta tatagcacag agatatactatag caaagagata	8520
ctttgagca atgtttgtgg aagcggtatt cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg	8580
gtgcgtttt gtttttga aagtgcgtc tcagagcgct tttggtttc aaaagcgctc	8640
tgaagttcct atacttcta gagaatagga acttcggaat aggaacttca aagcgttcc	8700

gaaaacgagc gctccgaaa atgcaacgagc agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt	8760
cgcacccata tcigcgtgtt gcctgtat atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg	8820
tgttatgct taaatgcgta cttatatgct tctattatg taggatgaaa ggtatctag	8880
tacccctgt gatatttatcc cattccatgc gggtatcgt atgcttcctt cagcaactacc	8940
ctttagctgt tctatatgct gccactcctc aattggatata gtctcatctc tcaatgctat	9000
cattccctt gatattggat catactaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa	9060
aaataggcgt atcacgaggc ccttcgtc	9089

<210> 59

<211> 672

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 59

agttcgagtt tattcatttac aatactgcca tttcaaagaa tacgttaata attaataatgt	60
gtgatttcc taactttatt tagtcaaaaa attagcctt taattctgct gtaacccgta	120
catgcccaaa atagggggcg ggttacacag aatataaac atcgttaggtg tctgggtgaa	180
cagtttattc ctggcatcca ctaaatataa tggagccgc ttttaagct ggcatccaga	240
aaaaaaaaaga atcccagcac caaaatattg ttttcttac caaccatcag ttcataggtc	300
cattcttta ggcactac agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc	360

tcaatggagt gatgcaacct gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gaccacgca	420
tgtatctatc tcattttctt acacccatca ttacctctg ctctctctga tttggaaaaa	480
gctgaaaaaa aaggttgaaa ccagttccct gaaattattc ccctacttga ctaataagta	540
tataaagacg gtaggtattt attgtatcc tggaaatcta tttcttaaac ttcttaatt	600
ctactttat agtttagtctt ttttttagtt ttaaaaacacc aagaacttag tttcgatataa	660
acacacataa ac	672

<210> 60

<211> 1023

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 60

caccgcggtg gggcgcccc tatttcgag gaccgtgtca cttgagccc aagagagcca	60
agatttaat ttcttatga ctgtatgcaa attccaaag ctaataacat gcaagacacg	120
tacggtaag aagacatatt tgaccttta acaggttcag acgcgactgc ctcatcgta	180
agacccgttg aaaaagaactt acctgaaaaa aacgaatata tactagcggtt gaatgttagc	240
gtcaacaaca agaagtttaa tgacgcggag gccaaggcaa aaagattcct tgattacgta	300
agggagtttag aatcattttg aataaaaaac acgttttc agttcgagtt tatcattatc	360
aatactgcca tttcaagaa tagtaaata attaatagta gtgatttcc taactttatt	420

tagtcaaaaa attagccttt taattctgt gtaaccgta catgccaaa atagggggcg	480
gtttacacag aatatataac atcgttagtg tctgggtgaa cagtttattc ctggcatcca	540
ctaaatataa tggagccgc tttaagct ggcattcaga aaaaaaaga atcccagcac	600
caaaatattt tttttcac caaccatcag ttcataggc cattcttta ggcactac	660
agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc tcaatggagt gatgcaacct	720
gcctggagta aatgtatgaca caaggcaatt gacccacgca tgtatctatc tcattttctt	780
acaccttcta ttaccttctg ctctctctga ttggaaaaa gctgaaaaaa aaggttgaaa	840

ccagttccct gaaattattc ccctacttga ctaataagta tataaagacg gtaggtattt	900
attgttaattc tgtaaatcta ttcttaaac ttcttaattt ctactttat agttgtctt	960
tttttagtt taaaacacc aagaacttag ttctgaataa acacacataa actagtaaac	1020
aaa	1023

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 61

caaaagctga gctccaccgc g	21
-------------------------	----

<210> 62

<211> 44

<212>

DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 62

gtttactagt ttatgtgtt ttattcgaaa ctaagttctt ggtg 44

<210> 63

<211> 8994

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> constructed plasmid

<400> 63

ctagttctag agcggccgcc accgcgggtgg agctccagct tttgttccct ttagtgaggg 60

ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgttcc ctgtgtgaaa ttgttatccg 120

ctcacaattc cacacaacat aggagccgga agcataaaagt gtaaaggcctg ggggcctaa 180

tgagtgaggt aactcacatt aattgcgttgc cgctcactgc ccgcatttcca gtcggaaac 240

ctgtcgtgcc agctgcattt atgaatcgcc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt 300

gggcgccttt ccgtttccctc gctcaactgac tcgctgcgtc cggtcggtcg gctgcggcga 360

gccccatcg ctcaactaaa ggccgttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 420

ggaaagaaca tggtagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaaa ggccgcgttg 480

ctggcggttt tccataggct ccgcggccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 540

cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgttccccc tggaagctcc 600

ctcggtcgct ctccgttcc gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttccct 660

tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgttaggt atctcagttc ggtgttagtc 720

gttcgcgtcca agctggcgtg tggcgtcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 780

tccggtaact atcgcttga gtccaaacccg gtaagacacg acttacgccc actggcagca 840

gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgttaggcg gtgtcacaga gttcttgaag 900

tggtaggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 960

ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgcgtcc gcaaacaac caccgctgg 1020

agcgggtggtt ttttggggta caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 1080

gatcccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtggaa acgaaaactc acgttaaggg 1140

atttgggtca tggatatttc aaaaaggatc ttcacccatca tcctttaaa taaaaatga 1200

agtttaaat caatctaaat tatatatgt taaacttggt ctgacagttt ccaatgttt 1260

atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctattcggt catccatagt tgcctgactc	1320
cccgctgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggcccaag tgctgcaatg	1380
ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga	1440
agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaaatgt	1500
tgccgggaag cttagactaag tagttcgcca gttaatagtt tgccgcaacgt tggtgccatt	1560
gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgctg tttggatgg cttcattcag ctccgggtcc	1620
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtca aaaaagcggt tagctccctc	1680
ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagttgt tatcactcat gttatggca	1740
gcactgcata attctttac tgcgtatgcca tccgttaagat gctttctgt gactgggtgag	1800
tactcaacca agtattctg agaatagtgt atgcggcgc acgatgtc ttgcccggcg	1860
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa	1920
cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaggatc ttaccgtgt tgagatccag ttgcgtatgaa	1980
cccaactcgac caccaactg atcttcagca tctttactt tcaccagcgt ttctgggtga	2040
gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataa gggcacacg gaaatgtga	2100
atactcatac ttttccttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg	2160
agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaacaaa taggggttcc ggcacattt	2220
ccccgaaaag tgccacactga acgaagcatc tgtgcttcat ttgttagaaac aaaaatgcaa	2280
cgcgagagcg ctaattttc aaacaaagaa tctgagctgc attttacag aacagaaatg	2340
caacgcgaaa gcgtatccc accaacgaa aatctgtgt tcattttgtt aaaaacaaaaa	2400
tgcaacgcga gagcgtaat tttcaaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag	2460
aaatgcaacg cgagagcgct attttaccaaa caaagaatct atacttcttt ttttttctac	2520
aaaaatgcat cccgagagcg ctattttctt aacaaagcat ctttagattac ttttttctc	2580
ctttgtgcgc tctataatgc agtctcttga taacttttg cactgttaggt ccgttaaggt	2640
tagaagaagg ctactttgtt gtctatccc tcttccataaa aaaaagctg actccacttc	2700
ccgcgtttac tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa aggcatcccc	2760
gattatattc tataccgatg tggattgcgc atactttgtt aacagaaagt gatagcggtt	2820
atgatttttc attggtcaga aaattatgaa cggttcttc tattttgtct ctatataacta	2880
cgtataggaa atgtttacat ttctgttattt tttctgttactt actctatgaa tagtttttac	2940
tacaatttt ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaatgt agaggtcgag	3000
tttagatgca agtcaagga gcaaaagggtt gatgggttggg ttatataaggg atatagcaca	3060
gagatataata gcaaaagagat acttttggc aatgtttgtt gaaagcggtt tcgcaatatt	3120

tttagtagctc gttacagtcc ggtgcgttt tggtttttggaaatgcgtc ttcaagagcgc	3180
ttttgggttt caaaagcgct ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa	3240
taggaacttc aaagcgttc cgaaaacgag cgcttccgaa aatgcacgc gagctgcgc	3300
catacagctc actgttcacg tcgcacccat atctgcgtgt tgccgtata tatatacata	3360
tgagaagaac ggcatagtgc gtgttatgc ttAAATGCGT acttatatgc gtctattat	3420
gttagatgaa aggtatcttacatc gtacccctg tgatattatc ccattccatg cgggtatcg	3480
tatgcttcct tcagcactac ccttagctg ttctatatgc tgccactcct caatggatt	3540
agtctcatcc ttcaatgcta tcatttcctt tgatattgga tcataactaag aaaccattat	3600
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg cccttcgtc tcgcgcgtt	3660
cgggtatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct	3720
gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg	3780
tcgggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgtt ctgagagtgc accatatcga	3840
ctacgtcgta aggcgttcc tgacagagta aaattcttga gggacttcc accattatgg	3900
gaaatgcttc aagaaggtat tgacttaaac tccatcaaat ggtcaggtca ttgagtgtt	3960
tttatttgggtt gtatTTTTTtttttagag aaaatcctcc aatataat taggaatcgt	4020
agtttcatga tttctgtta cacctaactt tttgtgtggt gccctccctcc ttgtcaatat	4080
taatgttaaa gtgcaattct tttccttat cacgttgagc cattagatc aatttgcita	4140
cctgtattcc ttactatcc tccttttct ccttcttgcataatgtatgt agattgcgtat	4200
tatagttcg tctaccctat gaacatattc cattttgtaa ttgcgtgtcg ttcttattat	4260
gaatttcatt tataaagttt atgtacaaat atcataaaaa aagagaatct tttaagcaa	4320
ggatTTCTT aacttctcg ggcacagcat caccgacttc ggtggactg ttggaaaccac	4380
ctaaatcacc agttctgata cctgcatacca aaacctttt aactgcatact tcaatggcct	4440
taccccttc aggcaagttc aatgacaatt tcaacatcat tgcagcagac aagatagtgg	4500
cgtatggtc aaccttattc ttggcaat ctggaggcaga accgtggcat ggttgcgtaca	4560
aaccaaatgc ggtgttctg tctggcaag aggccaaaggcgcagatggc aacaaaccca	4620
aggaacctgg gataacggag gtttgcgtgg agatgatatc accaaacatg ttgcgtgtga	4680
ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taacttagat catggcggca gaatcaatca	4740
attgtatgtt aacccatcaat gtagggaaatt cgttcttgcataatgttcc acagtttttc	4800
tccataatct tgaagaggcc aaaagattag cttagccaa ggaccaaata ggcaatggtg	4860

gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttcttgtat tctttgcact tctggAACGG	4920
tgtattgttc actatccaa gcgacaccat caccatgtc ttcccttctc ttaccaaAGT	4980
aaataacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt accttagca aattgtggct	5040
tgattggaga taagtctaaa agagagtgg atgcaaggat acatggctt aagtggcgt	5100
acaattgaag ttcttacgg attttagta aacctgttc aggtctaaca ctaccgtac	5160
cccatattgg accagccaca gcacctaaca aaacggcatc aaccttcttgggcttcca	5220
gcccctcatc tggaaagtggg acacctgttag catcgatagc agcaccacca attaaatgt	5280
tttcgaaatc gaacttgaca ttggaaacgaa catcagaata agcttaaga accttaatgg	5340
cttcggctgt gattcttga ccaacgtgg cacctggcaa aacgacgtc ttcttaggg	5400
cagacatagg ggcagacatt agaatggat atccttggaa tatataatata tattgctgaa	5460
atgtaaaagg taagaaaagt tagaaagtta gacgattgt aaccacat tggaaaaaac	5520
aataggtcct taaataatat tgtcaacttc aagtattgtg atgcaagcat ttagtcatga	5580
acgcttctt attctatatg aaaagccgt tccggcctt cacccttcccttttccca	5640
attttcagt tgaaaaaggt atatgcgtca ggccgacctt gaaattaaca aaaaatttcc	5700
agtcatcgaa ttgttattctg tgcgatagcg cccctgtgtg ttctcggtt gttgaggaaa	5760
aaaataatgg ttgctaagag attcgaactc ttgcatttgcgataacctga gtattccac	5820
agttaactgc ggtcaagata ttcttggaaat caggcgcctt agaccgctcg gccaacaac	5880
caattacttg ttgagaataa gaggataatt atcctataaa tataacgttt ttgaacacac	5940
atgaacaagg aagtacagga caatttggatt tgaagagaat gtggattttt atgttaattgt	6000
tggatttcca tttttataaa ggcataataa ttaggtatgt ggatataacta gaagtttcc	6060
tcgaccgtcg atatgcgtt gaaataccg cacagatgca taaggagaaa ataccgtac	6120
aggaaattgt aaacgttaat atttgttaa aattcgcgtt aaattttgt taaatcgat	6180
catttttaa ccaataggcc gaaatcgca aaatccctttaaaatcaaaa gaatagaccg	6240
agatagggtt gagttttgtt ccagtttggaa acaaggatcc actattaaag aacgtggact	6300
ccaaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac	6360
cctaatacg tttttgggg tcgaggtgcc gtaaaggact aaatcgaaac cctaaaggaa	6420
ccccccgatt tagagcttga cggggaaagc cggcgaaacgt ggcgagaaag gaaggaaaga	6480
aagcgaaagg agcggcgctt agggcgctgg caagtgttagc ggtcacgtcg cgcgtacca	6540
ccacacccgc cgccgttaat ggcgcgtac agggcgcttc ggcgcattcg ccattcaggc	6600
tgcgcaactg ttggaaaggcgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	6660
aagggggatg tgctgcaagg cgatcgatgtt gggtaacgcc agggtttcc cagtcacgac	6720

gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actataggc gaattggta	6780
ccgggccccc cctcgaggc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccg	6840
ggggatccgc atgcttgc ttagtcgtgc aatgtatgac tttaagattt gtgagcagga	6900
agaaaaggga gaatcttcta acgataaacc cttgaaaaac tgggtagact acgtatgtt	6960

gagttgctac gcaggctgca caattacacg agaatgctcc cgcctaggat ttaaggctaa	7020
gggacgtgca atgcagacga cagatctaaa tgaccgtgtc ggtgaagtgt tcgccaaact	7080
tttcggttaa cacatgcagt gatgcacgcg cgatggtgct aagttacata tataatata	7140
tataatata tagccatagt gatgtctaag taacctttat ggtatattc ttaatgtgga	7200
aagatactag cgcgcgcacc cacacacaag ctgcgtctt tcttgaagaa aagaggaagc	7260
tcgctaaatg ggattccact ttccgttccc tgccagctga tggaaaagg ttagtgttac	7320
gatgaagaat aaaaagagag atccactgag gtgaaatttc agctgacgc gagtttcatg	7380

atgaggcggt tggcgtcatt gaagaagtgg gcgaatccgt gacacaattc aaaaaggggg	7860
ataaagttt aatctccgc gttactagct gtggatcgtg tgattattgc aagaagcaac	7920
tgtattcaca ctgttagagac ggtggctgga ttttaggtt catgatcgac ggtgtccaag	7980
ccgaatacgt cagaatacca catgtgaca attcattgtt taagatcccg caaactatcg	8040
atgtgaaat tgcaactacta ctgtccgata ttttacctac tggacatgaa attgggttgc	8100
aatatggtaa cgttcaacca ggcgatgctg tagcaattgt aggagcaggt cctgttgaa	8160
tgtcagttt gttaactgct caatttact cgccctagtagc cattattgtt atcgacatgg	8220

acgaaaaccttatacaatttgcgaaggagcttggggccacacacactattaaactccggta	8280
ctgaaaatgttgtcgaagctgtgcatacgataggatggatgtgcataatag	8340
aagctgttggtataccgcacacctggacatctgtcaggaattgtaaaaccggcgctc	8400
atattgccaa cgtggagttcatgggtttaggtggactttgaaattcaa aagtgtgga	8460
ttaagaatctaacccatcaccactggttgtttaacactaa tactacccatgttgatga	8520
aggtagccctctactgtataaaatgcctttaaagaaaaatgtacttcacaggtttgagttag	8580

ctgaaatcga acacgcatac caggtttct tgaatggcgc taaagaaaaa gctatgaaga 8640

ttattctatc taatgcaggt gccgccta at taattaagag taagcgaatt tcttatgatt 8700
 tatgattttt attattaaat aagttataaa aaaaataagt gtatacaa at tttaaagtga 8760
 ctcttaggtt taaaacgaa aattcttatt cttagttaac tcttcctgt aggtcaggtt 8820
 gcttctcag gtatagcatg aggtcgcctt tattgaccac acctctaccg gcatgccgag 8880
 caaatgcctg caaatcgctc cccatttac ccaattgttag atatgcta ac tccagcaatg 8940
 agttgatgaa tctcggtgt tattttatgt cctcagagga caacacctgt ggta 8994

<210> 64

<211> 753

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 64

gcatgctgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg 60
 gagaatcttc taacgataaa cccttgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgt 120
 acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg attaaggct aaggacgtg 180
 caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcggtgaagt gttcgccaaa ctttcggtt 240
 aacacatgca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tatatatata tatagccata 300
 gtgatgtcta agtaacctt atggatatatt tcttaatgtg gaaagatact agcgcgcga 360
 cccacacaca agttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa tgggattcca 420

ctttccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgtgaaga ataaaaagag 480
 agatccactg aggtgaaatt ttagtgcaca gcgagttca tgatgtgt gaacaatgg 540
 aacgagttgt ggctgttgcc agggagggtg gttctcaact ttaatgtat ggccaaatcg 600
 ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctt cctcctt 660
 gtccttctt aattctgttg taattacctt ccttgcata tttttgtt attattttc 720
 ttaataatcc aaacaacac acatattaca ata 753

<210> 65

<211> 316

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 65

gagtaagcga atttctttagt atttatgatt tttattatata aataagttt aaaaaaaaata 60

agtgtataca aatttaaag tgactcttag gttttaaac gaaaattctt attcttgagt	120	
aactcttcc tgttaggtcag gttgcttct caggtatagc atgaggtcgc tcttattgac	180	
cacacctcta ccggcatgcc gagcaaatgc ctgcaaatcg ctccccattt caccbaattg	240	
tagatatgct aactccagca atgagtttgat gaatctcggt gtgtatttta tgtcctcaga	300	
ggacaacacc tgtggt	316	
<210> 66		
<211> 39		
<212> DNA		
<213>		
> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 66		
cacacatatt acaatagcta gctgaggatg aaagctctg	39	
<210> 67		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> primer		
<400> 67		
cagagcttc atcctcagct agctattgtat atatgtgt	39	
<210> 68		
<211> 9491		
<212> DNA		
<213> artificial sequence		
<220><223> constructed plasmid		
<400> 68		
tcgcgcgtt cggtgatgac ggtaaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta	60	
cagcttgtct gtaagcggat gccggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggt	120	
ttggcgggtg tcgggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgtat ctgagagtgc		180
accataaatt cccgtttaa gagcttggtg agcgcttagga gtcactgcca ggtatcgtt	240	
gaacacggca ttagtcaggg aagtataac acagtcctt cccgcaattt tcttttcta	300	
ttactcttgg cctcctctag tacactctat attttttat gcctcgtaa tgatttcat	360	
ttttttttt cccctagcgg atgactctt tttttctta gcgattggca ttatcacata	420	
atgaattata cattatataa agtaatgtga tttctcgaa gaatatacta aaaaatgagc	480	

aacaagagga actacacgga agctctaaag atggcaacca gccagaaaact aagaaaatga	2280
agttgatgga tccaactggc accgctggct tgaacaacaa taccaggctt ccaacttctg	2340
taaataacgg cggtaacgcca gtgccaccag taccgttacc ttccggata cctccttcc	2400
ccatgttcc aaigcccttc atgcctccaa cggtactat cacaatctt catcaagctg	2460
acgcaagccc taagaaatga ataacaatac tgacagtact aaataattgc ctacttggct	2520
tcacatacgt tgcatcgtc gatatagata ataatgataa tgacagcagg attatgtaa	2580
tacgtaatag ttgaaaatct caaaaatgtg tgggtcatta cgtaaataat gataggaatg	2640
ggattttctt attttcctt tttccattct agcagccgtc gggaaaacgt ggcattctct	2700
ctttcggct caattggagt cacgctgccc tgagcatcct ctctttccat atctaacaac	2760
tgagcacgta accaatggaa aagcatgago ttagcgttgc tccaaaaaag tattggatgg	2820
ttaataccat ttgtctgttc tcttctgact ttgactcctc aaaaaaaaaa aatctacaat	2880
caacagatcg cttaattac gccctcacaa aaacttttt ctttcttctt cgcccacgtt	2940
aaattttatc cctcatgttg tctaacggat ttctgcactt gatttattat aaaaagacaa	3000
agacataata ctctctatc aatttcagtt attgttcttc ctgcgttat tcttctgttc	3060
ttcttttctt ttgtcatat ataaccataa ccaagtaata catattcaaa ctagtatgac	3120
tgacaaaaaaaaa actcttaaag acttaagaaa tcgttagttct gtttagattt caatggtaa	3180
atcacctaattt cgtgctatgt tgcgtcaac tggtatgcaaa gatgaagact ttgaaaaacc	3240
tatcgtcggt gtcatttcaa cttggctga aaacacaccc tggatatcc acttacatga	3300
ctttggtaaa ctagccaaag tcgggttaa ggaagctggt gctggccag ttcagttcg	3360
aacaatcagc ttctctgtatc gatcgccat gggaaacccaa ggaatgcgtt tctccttgac	3420
atctcgtatc attattgcag attctattga agcagccatg ggaggtcata atgcggatgc	3480
ttttgttagcc attggcggtt gtgataaaaaa catgccccgt tctgttatcg ctatggctaa	3540
catggatatac ccagccattt ttgcttacgg cggaacaattt gcacctggta atttagacgg	3600
caaagatatac gatttatgtt ctgtcttga aggtgtcgcc cattggaaacc acggcgatata	3660
gacccaaagaa gaagttaaag ctttggatag taatgttgtt cccggctctg gaggctgg	3720
tggatgtatc actgctaaca caatggcgac agctattgaa gttttggac ttgccttcc	3780
gggttcatct tctcacccgg ctgaatccgc agaaaaagaaa gcagatattg aagaagctgg	3840
tcgcgtgtt gtcaaaatgc tcgaaatggg cttaaaaccc tctgacattt taacgcgtga	3900
agctttgaa gatgttattt ctgttaactat ggctctgggaa ggttcaacca actcaaccct	3960
tcacctttaa gttttttttt atgctgtttaa tggatgttgc acacttgcattt atttcaatac	4020
tttccaagaa aaagttccctc atttggctga ttggaaaccc tctggtaat atgtattcca	4080

agaccttac aaggctggag gggtaaccgc agttatgaaa tatctcctta aaaatggctt	4140
ccttcatggt gaccgtatca ctgtactgg caaaacagtc gctgaaaatt tgaaggctt	4200
tgtatgatcca acacctggtc aaaaggttat tatgccctt gaaaatccta aacgtgaaga	4260
tggccgctc atiattctcc atggtaactt ggctccagac ggtgccgttg ccaaagttc	4320
tggtgtaaaa gtgcgtcgtc atgtcggtcc tgcttaaggc ttttaattctg aagaagaagc	4380
cattgaagct gtcttgaatg atgatattgt tggatggatgat gttgttgtcg tacgtttgt	4440
aggaccaaaag ggcggtcctg gtatgcctga aatgcttcc ctttcatcaa tggatgttgg	4500
taaaggccaa ggtgaaaaag ttgccttct gacagatggc cgcttcgtt gttgttgg	4560
tggcttgcgtc gtgggtcata tcgctccgtt agcacaagat ggccgtccaa tcgccttacct	4620
gcaaacagga gacatagtca ctattgacca agacactaag gaattacact ttgatatctc	4680
cgatgaagag taaaacatc gtcaagagac cattgaatg ccaccgtctt attcacgcgg	4740
tatccttggtaaaatgctc acatcggttgc gtctgttctt aggggagccg taacagactt	4800
ttggaaagctt gaagaaactg gcaaaaaatg ttgtcctgggt tgctgtgggtt aagcggccgc	4860
gttaattcaa attaattgtt atagttttt aatgagtattt gaatctgtttt agaaataatg	4920
gaatattttt ttatatttattt tatttatattt attggtcggc tctttcttc tggatgttgg	4980
tgacaaaatg atatgaagga aataatgattt tctaaatattt tacaacgtt gatatttttta	5040
caaaagccata gctcatctt tgcgtatgcac tattttactc acgttggaaa ttacggccaa	5100
gtccactgctg gagtcatcc ttatcgatctt atcggtttt atagcttattt	5160
ttggagttcg cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aatttttattt tcattctggaa	5220
actcttcgag ttctttgtaa agtcttcat agtagtttac ttatcctcc aacatattta	5280
acttcatgtc aatttcggctt cttaaattttt ccacatcatc aagttcaaca tcatttttta	5340
acttgaattt attctctagc tttccaaacc aagccttattt gtccttgcattttt ttactgttgg	5400
aaagtgtatac actttgcgcg caatccaggtaaaaacttttctgcaaaagaa ttccaccaattt	5460
tctcgacatc atagtacaat ttgttttttctccatcac aatttatattt acctgtatggaa	5520
ttcttatgaa gcgctgggtt atggacgtgtt cactctactt cgccttttc cctactcctt	5580
tttagtacgga agacaatgct aataaataag aggtaataaa taatattattt aatcgccaaa	5640
aaagataaaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaaac gtcgttccaa tccttgaatg	5700
cttcccaattt gtatattaag agtcatcaca gcaacatattt ctgttatttta aatattat	5760
tattgatttt tggatattgtttaaaaaacc aatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat	5820
accaagtatg gagaatataa tttagaagtctt atacgttaaa ccaccgttggccatggatccag	5880
cttttgttcc cttagtggatggtaattgc gcgcttggccatggatccatgtt	5940

tcctgtgtga aattgttatac cgctcacaat tccacacaac ataggagccg gaagcataaa	6000
gtgtaaagcc tgggtgcct aatgagttag gtaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact	6060
gcccgccttc cagtcggaa acctgtcgta ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	6120
ggggagaggc gtttgcgtt ttggcgctc ttccgcgttcc tcgctcactg actcgctgcg	6180
ctcggtcggtt cggtcgccg gaggcgatc agctcactca aaggcgtaa tacggttatac	6240
cacagaatca gggataacg cagggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag	6300
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcggcc ctgacgagca	6360
tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca	6420
ggcgtttccc cctggaagct ccctcggtcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttacgg	6480
ataccgttcc gccttcgtcc ctgcggaaag cgtggcgctt tctcatagct cacgtgttag	6540
gtatctcagt tcgggttagg tcgttcgtc caagctggc tgtgtgcacg aaccccccgt	6600
tcagcccgac cgctgcgcct tatccgtaa ctatgtt gagtccaaacc cggtaaagaca	6660
cgacttatacg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgttag	6720
cggtgctaca gagttttga agtggtgcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt	6780
tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctgcggaaaa agagttggta gctcttgatc	6840
cggcaaacaa accaccgctg gtacgggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg	6900
cagaaaaaaa ggttctcaag aagatccttt gatctttct acggggcttg acgctcagt	6960
gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgtt catgagatta tcaaaaagga tcttaccta	7020
gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtataatag agtaaacttg	7080
gtctgacagt taccatgtt taatcgtga ggcacccatc tcagcgatct gtctattcg	7140
ttcatccata gttgcctgac tccccgtcggt gtagataact acgatacggg agggcttacc	7200
atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agacccacgc tcaccggctc cagatttatac	7260
agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcgcagaatg ggtcctgcaatcttacccgc	7320
ctccatccag tctattaattt gttggccggaa agcttagagta agtagttcgc cagttatag	7380
tttgcgcac gttgttgcca ttgtacagg catcggtgt tcacgctcgat cgttggat	7440
ggcttcattc agtcccggtt cccaaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccattttgt	7500
caaaaaagcg gttagctcct tcggcttc gatcggtgtc agaagtaatg tggccgcgt	7560
gtttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctttt actgtcatgc catccgtaa	7620
atgcctttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcatc tgagaatagt gtatgcggcg	7680

accgagttgc tcttgcggc cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaactt	7740
aaaagtgc atcattggaa aacgttctc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgt	7800
gtttagatcc agttcgatgt aacccactcg tgcacccaac tgcacccaac catctttac	7860
tttaccaggc gtgtcggtt gagcaaaaac aggaaggca aatgcccaa aaaagggaaat	7920
aaggcgaca cgaaaaatgtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat	7980
ttatcagggtt tattgtctca tgagcgata catattgaa tgtatttaga aaaataaaca	8040
aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgcacccgtt gaacgaagca tctgtgttc	8100
attttgtaga acaaaaatgc aacgcgagag cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct	8160
gcattttac agaacagaaa tgcaacgcga aagcgttattt ttaccaacga agaatctgt	8220
cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgcg gagagcgcta attttcaaa caaagaatct	8280
gagctgcattt ttacagaac agaaatgca cgcgcgagcg ctatttacc aacaaagaat	8340
ctatacttct ttttggctt acaaaaatgc atcccggagag cgctatttt ctaacaaagc	8400
atcttagatt acttttttc tccttgcgtc gctctataat gcagtcctt gataacttt	8460
tgcactgttag gtccgttaag gtttagaagaa ggctacttgcgtt tctttccat	8520
aaaaaaagcc tgactccact tcccgcggtt actgattact agcgaagctg cgggtgcatt	8580
ttttcaagat aaaggcatcc ccgattatattt tctataccga tgtggattgc gcatacttt	8640
tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct tcattggtca gaaaattatg aacggtttct	8700
tctatttgt ctctatatac tacgtatagg aaatgtttac atttcgat ttttcgtat	8760
tcactctatg aatagttctt actacaattt ttttgcataa agagtaatac tagagataaa	8820
cataaaaaat gttagaggtcg agtttagatg caagtcaag gagcggaaagg tggatggta	8880
ggttatatacgatatagca cagagatata tagcaaagag atactttga gcaatgttt	8940
tggaagcggtt attcgcaata ttttagtagc tcgttacagt ccggcggtt tttgggtttt	9000
tgaagtgcg ttttcagagc gctttgggtt ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt	9060
ctagagaata ggaacttcgg aataggaact tcaaagcggtt tccggaaacgc agcgcttcg	9120
aaaatgcaac gcgcgactcg cacatacgcg tcactgttca cgtgcacccgtt atatctgcgt	9180
gttgccgtat tataatata catgagaaga acggcatagt gcgtgtttat gcttaatgc	9240
gtacttataat ggcgttattt atgttagatg aaaggtatgc tagtacccgtt tgtgtatata	9300
tcccatcca tgcgggtat cgtatgttc ctccagactt acccttgcgtt tttctatata	9360
gctgccactc ctcaatttggaa ttgtctcat cttcaatgc tatcattcc tttgtatatt	9420
gatcatctaa gaaaccattt ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag	9480
gcccttcgtt c	9491

<210> 69

<211> 1000

<212> DNA

<213> *Saccharymoces cerevisiae*

<400> 69

gttaattcaa attaatttat atagttttt aatgaggatt gaatctgtt agaaataatg	60
gaatattatt ttatatttatt tatttatatt attggtcggc tctttcttc tgaaggtcaa	120
tgacaaaatg atatgaagga aataatgatt tctaaaattt tacaacgtaa gatattttta	180

caaaaggcta gcicatctt tgcacatgcac tattttactc acgcttgaaa ttaacggcca	240
gtccactgcg gagtcatttc aaagtcatcc taatcgatct atcggtttt atagctcatt	300
ttggagttcg cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aattttattt tcatttgga	360
actttcgag ttctttgtaa agtcttcat agtagcttac ttatcctcc aacatattta	420
acttcatgtc aatttcggct cttaaatttt ccacatcatc aagttcaaca tcatctttta	480
acttgaattt attctctagc tcttccaacc aagcctcatt gtccttgat ttactggta	540
aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaacttcc ctgcaaaagaa ttcaccaatt	600

tctcgacatc atagtacaat ttgtttgtt ctcccatcac aatthaatat acctgatggaa	660
ttcttatgaa ggcgtggta atggacgtgt cactctactt cgccttttc cctactcctt	720
tttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtaataa taatattattt aatcgcaaa	780
aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcttaccaa tccttgaatg	840
cttcccaattt gtatattaag agtcatcaca gcaacatattt ctgttattt aattaattat	900
tattgatttt tgatattgta taaaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat	960
accaagtatg gagaatata tttagtctt atacgtttaaa	1000

<210> 70

<211> 760

<212> PRT

<213> *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 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

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
 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
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
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
Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr Ile Arg Val Ser Gly Tyr		
725	730	735
Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Lys Glu 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> Escherichia coli

<400> 71

atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctggaaag gtttaccaa aggtgactgg	60
cagaatgaag taaacgtccg tgacttcatt cagaaaaact acactccgt a cgagggtgac	120
gagtccttcc tggctggcgc tactgaagcg accaccaccc tgtggacaa agtaatggaa	180
ggcgttaaac tgaaaaaccg cactcacgca ccagttgact ttgacaccgc tggcttcc	240
accatcacct ctcacgacgc tggctacatc aacaagcagc ttgagaaaaat cgttggctcg	300
cagactgaag ctccgctgaa acgtgcttt atccggtcg gtggatcaa aatgatcgaa	360
ggttcctgca aagcgtacaa ccgcgaactg gatccgatga taaaaaaaaat cttcactgaa	420
tacggtaaaa ctcacaacca gggcgtgttc gacgttaca ctccggacat cctgcgtgc	480
cgttaatctg gtgttctgac cggctgcca gatgcatatg gccgtggccg tatcatcggt	540
gactaccgtc gcgttgcgt gtacggatc gactaccta taaaagacaa actggcacag	600
ttcacttctc tgcaggctga tctggaaaac ggcgtaaacc tggAACAGAC tatccgtctg	660
cgcgaagaaa tcgctgaaca gcacccgcgt ctgggtcaga taaaagaaaat ggctgcgaaa	720
tacggctacg acatctctgg tccggctacc aacgctcagg aagctatcca gtggacttac	780
ttcggctacc tggctgtgt taagtcttag aacgggtcgtg caatgtcctt cggtcgtaacc	840
tccacccccc tggatgtgtt catcgaaactg gacctgaaag ctggcaagat caccgaacaa	900
gaagcgcagg aatgggtga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg cttccctgcgt	960
actccggaaat acgtgaact gttctctggc gacccgatct gggcaaccga atctatcggt	1020
ggtatggcc tcgacgggtcg taccctggtt accaaaaaca gttccgttt cctgaacacc	1080
ctgtacccca tgggtccgtc tccggaaaccg aacatgacca ttctgtggtc taaaactg	1140
ccgctgaact tcaagaaatt cgccgctaaa gtgtccatcg acaccccttc tctgcagttat	1200
gagaacgatg acctgatgcg tccggacttc aacaacgatg actacgctat tgctgtgc	1260
gtaagcccgta tgcgttgg taaacaaatg cagttttcg gtgcgcgtgc aaacccggcg	1320
aaaaccatgc tgtacgcaat caacggcggc gttgacgaaa aactgaaaat gcagggtgg	1380
ccgaagtctg aaccgatcaa aggcgatgtc ctgaactatg atgaagtgtat ggagcgcgt	1440
gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacatcactg cactgaacat catccactac	1500
atgcacgaca agtacagcta cgaaggctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttac	1560
cgcaccatgg cgtgtggat cgctggctcg tccgttgctg ctgactccct gtctgcaatc	1620
aaatatgcga aagttaaacc gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga ctgcgaaatc	1680

gaaggcgaat acccgagtt tggtaacaat gatccgcgtg tagatgacct ggctgttac 1740
 ctggtagaac gttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgtga cgctatccg 1800
 actcagtctg ttctgaccat cacttctaac gttgtgtatg gtaagaaaac ggtaaacacc 1860
 ccagacggtc gtcgtctgg cgccgcgtc ggaccgggtg ctaaccgtat gcacggcgt 1920
 gaccagaaag gtgcagtagc ctctctgact tccgttgcta aactgcgtt tgcttacgct 1980
 aaagatggta tctctacac cttctctatc gttccgaacg cactggtaa agacgacgaa 2040

gttcgttaaga ccaacctggc tggctgtat gatggtaact tccaccacga agcatccatc 2100
 gaagggtggc agcacctgaa cgttaacgtg atgaaccgtg aaatgctgct cgacgcgtat 2160
 gaaaaccgg aaaaatatcc gcagctgacc atccgtat ctggctacgc agtacgttcc 2220
 aactcgtga ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtaccttac tcaatctatg 2280
 taa 2283

<210> 72

<211> 244

<212> PRT

<213> 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 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	

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
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
Leu Lys Pro Arg		

<210> 73

<211> 735

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 73

atggctgaga tggaaaacct gaaaatttag gttggcgct ataaccgga agtcgatacc	60
gcaccgcata ggcattctta tgaagtgcct tatgacgcaa ctacccatt actggatgcg	120
ctggcgataca tcaaagacaa cctggcacgg gacctgagct accgctggtc ctgcgtatg	180
gcgatttgtg gttcctgcgg catgatggtt aacaacgtgc caaaactggc atgtaaaacc	240
ttcctgcgtg attacaccga cggatgtttttt gttgaagggt tagctaactt cccgattgaa	300
cgcgatctgg tggcgatata gaccacttc atcgaaatgc tggaaatcgat caaaccgtac	360
atcatggca actccgcac cgcggatcgat ggtactaaca tccagacccc ggcgcagatg	420
gcgaagtatc accagttctc cggatgcata aactgtggtt tggctacgc cgcgtcccc	480
cagttggcc tgaacccaga gttcatcggt ccggctgcca ttacgctggc gcatcgat	540
aacgaagata gcccgcacca cggtaagaag gagcgtatgg cgcgttgaa cagccagaac	600

ggcgtatgga gctgtacttt cgtggctac tgctccgaag tctgcccga acacgtcgat 660
 ccggctgcgg ccattcagca gggcaaagta gaaagttcga aagactttct tatcgcgacc 720
 ctgaaaccac gctaa 735
 <210> 74
 <211> 891
 <212> PRT
 <213> 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 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

Asp Asn Gly Val Ile Cys Ala Ser Glu Gln Ser 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

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 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

Pro Gln Ala 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 Ala Lys Lys Ser Ala

885 890

<210> 75

<211> 2676

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 75

atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtaaa aaaagccag	60
cgtgaatatg ccagttcac tcaagagcaa gtagacaaaa tcttccgcgc cgccgctctg	120
gctgctgcag atgctcaat cccactcgcg aaaatggccg ttgccgaatc cgccatgggt	180
atcgctcaag ataaaagtat caaaaaccac ttgcttcgt aatatactca caacgcctat	240
aaagatgaaa aacccgtgg tggctgtct gaagacgaca ctttggtagt catcaactatc	300
gctgaaccaa tcggattat ttgcgttac gttccgacca ctaacccgac ttcaactgct	360
atcttcaaat cgctgatcag tctgaagacc cgtaacgcca ttatcttctc cccgcacccg	420
cgtgcaaaag atgccaccaa caaagcggct gatatcgatc tgcaggctgc tatcgctgcc	480
ggtgctccga aagatctgat cggctggatc gatcaacctt ctgttgaact gtctaacgca	540
ctgatgcacc acccagacat caacctgatc ctcgcgactg gtggccggg catggtaaa	600
gccgcataca gctccgtaa accagctatc ggtgttaggcg cggcaacac tccagtttt	660
atcgatgaaa ctgctgat caaacgtca gttgcatttgc tactgatgtc caaaacccat	720
gacaacggcg taatctgtgc ttctgaacag tctgttgtt tggttgactc tggttatgac	780
gctgtacgt aacgtttgc aacccacggc ggctatctgt tgcaaggtaa agagctgaaa	840
gctgttcagg atgttatcct gaaaaacggt ggcgtgaacg cggctatcgt tggtcagcca	900
gcctataaaa ttgctgaact ggcaggcttc tctgtaccag aaaacaccaa gattctgatc	960
gtgtgaagtga ccgttgttga taaaagcgaa ccgttgcac ataaaaact gtcccccact	1020
ctggcaatgt acccgctaa agatttcgaa gacgcggtag aaaaagcaga gaaactggtt	1080
gctatggcg gtatcggtca tacctttgc ctgtacactg accaggataa ccaacccgct	1140
cgcgtttctt acttcggtca gaaaatgaaa acggcgcgtt tcctgattaa caccggcg	1200
tctcagggtt gtagtgcgtt cctgtataac ttcaaactcg cacctccct gactctgggt	1260
tgtggttctt ggggtggtaa ctccatctct gaaaacgtt gtcggaaaca cctgtatcac	1320
aagaaaaccc ttgctaaagcg agctgaaaac atgttgcgc acaaacttcc gaaatctatc	1380
tacttccgccc gtggctccct gccaatcgcg ctggatgaag tgattactga tggccacaaa	1440
cgtgcgtca tcgtgactga ccgttccgt ttcaacaatg gttatgtca tcagatcact	1500
tccgtactga aagcagcagg cgttgcggaaact gaagtcttct tcaagatgaa agcggacccg	1560
accctgagca tcgttgcgtt aaaggcggaa ctggcaaaact cttcaaaacc agacgtgatt	1620
atcgctcgtt gggtgggtt cccatggac gccgcgaaga tcatgtgggt tatgtacgaa	1680
catccggaaa ctcaattcgtt agagctggcg ctgcgttta tggatatccg taaacgtatc	1740

tacaaggttcc cgaaaatggg cgtgaaagcg aaaatgatcg ctgtcaccac cacttctggt	1800
acaggttctg aagtcaactcc gtttgcgtt gtaactgacg acgctactgg tcagaaaat	1860
ccgctggcag actatgcgt gactccggat atggcgattg tcgacgcca cctggttatg	1920
gacatgccga agtccctgtg tgctttcggt ggtctggacg cagtaactca cgccatggaa	1980
gcttatgttt ctgtactggc atctgagttc tctgatggc aggctctgca ggcactgaaa	2040
ctgctgaaag aatatctgcc agcgtcctac cacgaagggt ctaaaaatcc ggtagcgcgt	2100
gaacgtgttc acagtgcagc gactatcgcg ggtatcgctt tgcgaaacgc cttcctgggt	2160

gtatgtcaact caatggcgca caaactgggt tcccaggttcc atattccgca cggtctggca	2220
aacgccctgc tgattttaa cgttatcgca tacaatgcga acgacaaccc gaccaaggcag	2280
actgcattca gccagtatga ccgtccgcag gctcgccgtc gttatgctga aattgcccac	2340
cacttgggtc tgagcgcacc gggcgaccgt actgtgtcta agatcgagaa actgtggca	2400
tggctggaaa cgctgaaagc tgaactgggt attccgaaat ctatccgtga agctggcgtt	2460
caggaaggcag acttccctggc gaacgtggat aaactgtctg aagatgcatt cgatgaccag	2520
tgcaccggcgc ctaacccgcg ttacccgctg atctccgagc tgaacacagat tctgctggat	2580

acctactacg gtcgtgatta tgtagaagggt gaaactgcag cgaagaaaaga agctgctccg	2640
gctaaagctg agaaaaaaagc gaaaaaaatcc gcttaa	2676

<210> 76

<211> 329

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 76

Met Lys Leu Ala Val Tyr Ser Thr Lys Gln Tyr Asp 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
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
Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Arg Asp Leu Phe Phe Glu Asp Lys Ser		
240	245	250
Gln Ala Ala Ile Glu Ala Leu Lys Asn Gln Lys Ile Gly Ser Leu Gly		
255	260	265
Asn Asp Val Ile Gln Asp Asp Val Phe Arg Arg Leu Ser Ala Cys His		
270	275	280
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
Gly Glu Thr Cys Pro Asn Glu Leu Val		
320	325	

<210> 77

<211> 990

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 77

atgaaactcg ccgttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacctgca acaggtgaac	60
gagtccttg gcttgagct ggaattttt gacttctgc tgacggaaaa aaccgctaaa	120
actgccaatg gctgcgaagc ggtatgtatt ttcgtaaacg atgacggcag ccgcccggtg	180

ctggaagagc taaaaaagca cggcgtaaa tatacgccc tgcgtgtgc cggttcaat	240
aacgtcgacc ttgacgcggc aaaagaactg gggctgaaag tagtccgtgt tccagcctat	300
gatccagagg ccgttgctga acacgccatc ggtatgtatg tgacgctgaa ccgcgttatt	360
caccgcgcgt atcagcgtac ccgtgatgtct aacttcttc tggaaaggctt gaccggctt	420
actatgtatg gcaaaacggc aggcgttac ggtaccgta aaatcggtgt ggcgatgctg	480
cgcattctga aaggtttgg tatgcgtctg ctggcggtcg atccgtatcc aagtgcagcg	540
gcccgtggaaac tcgggtgtgaa gtatgtcgat ctgccaaccc tggctctga atcagacgtt	600

atctctctgc actgcccgt gacaccggaa aactatcatc tggtaacga agccgccttc	660
gaacagatga aaaatggcgt gatgatcgatc aataccagtc gcggtgcatt gattgattct	720
caggcagcaa ttgaagcgct gaaaaatcag aaaattggtt cggtggat ggacgtgtat	780
gagaacgaac gcgatctatt ctttgaagat aaatccaacg acgtgatcca ggtgacgta	840
ttccgtcgcc tgcgtgcctg ccacaacgtg ctgtttaccg ggcaccaggc attcctgaca	900
gcagaagctc tgaccagtat ttctcagact acgctgcaaa acttaagcaa tctggaaaaaa	960
ggcggaaacctt gcccgaacga actggttaa	990

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> primer

<400> 78

tcatcactga taacctgatt ccgg	24
----------------------------	----

<210> 79

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer	
<400> 79	
cgagtcgtt ttggcagtca ccttaa	26
<210> 80	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 80	
gagcgtgacg acgtcaactt cct	23
<210> 81	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 81	
cagttcaatg ctgaaccaca cag	23
<210> 82	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 82	
gaaggttgcg cctacactaa gca	23
<210> 83	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 83	
gggagcggca agattaaacc agt	23
<210> 84	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 84	
tggatcacgt aatcagtacc cag	23
<210> 85	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 85	
atccttaact gatcggcatt gcc	23
<210> 86	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 86	
ggaattcaca catgaaagct ctggtttac	30
<210> 87	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 87	
gcgtccaggg cgtcaaagat caggcagc	28
<210> 88	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220><223> primer	
<400> 88	
gacctaggag gtcacacatg aaagctctgg	30
<210> 89	

<211> 25

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 89

cgactctaga ggtatcccggttacc 25

<210> 90

<211> 602

<212> PRT

<213> 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 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
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
Gly Ile Leu Met Thr Glu Gly Cys Arg Gly Glu 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
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
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

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

545 550 555 560

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 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> Escherichia coli

<400> 91

gtgcaaacct ttcaagccga tcttgcatt gtaggcggc gtggcgccgg attacgtgct 60

gcaattgctg ccgcgcaggc aaatccgaat gcaaaaatcg cactaatctc aaaagtatac 120

ccgatgcgt a cccataccgt tgctgcagaa gggggctcg ccgctgtcgc gcaggatcat	180
gacagctcg aatatcactt tcacgataca gtagcgggtg gcgactgggt gtgtgagcag	240
gatgtcggtt attatttcgt ccaccactgc ccaaccgaaa tgacccaact ggaactgtgg	300
ggatgccat ggagccgtcg cccggatgtt agcgtaacg tacgtcgctt cggccgcgt	360
aaaatcgagc gcacctgggtt cgccgcgtat aagaccggct tccatatgtt gcacacgctg	420
ttccagacct ctctgcaatt cccgcagatc cagcggtttt acgaacatgtt cgtgctggat	480
attctggttt atgatggta tttcgccgc ctggtagcaa tgaacatgtt ggaaggcactg	540
ctgggtgcaga tccgtgctaa cgcggcggtt atggctactg gcggtgcggg tcgcgttat	600
cgttacaaca ccaacggcggtt catcggttacc ggtgacggta tgggtatggc gctaagccac	660
ggcggttccgc tgcgtgacat ggaattcggtt cagtatcacc caaccggctt gccaggttcc	720
ggtatctgtt tgaccgaagg ttggcggtt gaaggcggtt ttctggtaaa caaaaatggc	780
taccgttatac tcaagatgtt cggcatgggc cggaaactc cgctggcgtt gccgaaaaac	840
aaatataatgg aactgggtcc acgcgacaaa gtctctcagg cttctggca cgaatggcgt	900
aaaggcaaca ccatctccac gccgcgtggc gatgtggttt atctcgactt gcgtcacctc	960
ggcgagaaaa aactgcgttga acgtctgcgtt ttcgttgcgtt aactggcgaa agcgtacgtt	1020
ggcggtcgatc cggttaaaga accgattccg gtacgtccga ccgcacacta caccatggc	1080
ggtatcgaaa ccgatcgaa ctgtgaaacc cgcattaaag gtctgttgcgtt cgtgggtgaa	1140
tgttccctgtt ttggctgtca cgggtcaaac cgtctgggtt ctaactccctt ggcggaaactg	1200
gtggcttcgtt gccgtctggc cggtaacaa gcgcacagac gtgcagcaac tgccgttata	1260
ggcaacgaag cggcaattgttga agcgcaggca gctggcggtt aacaacgtt gaaagatctg	1320
gttaaccagg atggcggttga aaactggcggtt aagatccgtt gacaaatggcgtt cctggctatg	1380
gaagaaggct gcggttatcta ccgtacgcgtt gaactgtatgc agaaaaccat cgacaagctg	1440
cgagagctgc aggaacgcgtt caagcgcgtt cgcgttaccgc acactttccat cgttcaac	1500
accgacactgc tctacaccat tgaactgggc caccgttgcgtt acgttgcgtt atgtatggcg	1560
cactccgttcaaa tggcacgttcaaa agagtcccgcc ggcgcgttacc acgttgcgtt cgaagggttgc	1620
accgagcgttgc acgacgttcaaa cttccctcaaa cacaccctcg cttccgttgcgtt tgctgtatggc	1680
acgactcgcc tggagtacag cgacgttcaaa attactacgc tggccgttacc taaacgcgtt	1740
tacgttgcgtt aagcggatgc agccgataag ggcggaaaggcgtt ccaataagaa ggagaaggcgtt	1800
aatggctgttga	1809
<210> 92	
<211> 131	

<212> PRT

<213> 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

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> Escherichia coli

<400> 93

atgacgacta aacgtaaacc gtagtacgg ccaatgacgt ccacctgggt gaaaaatttg 60

ccgtttatc gctttacat gctgcgcgaa ggcacggcgg ttccggctgt gtggttcagc 120

atgaaactga tttcggcgt gttgccctg aaaaatggcc cggaaacctg ggcgggattc 180

gtcgacttt tacaaaaccc gtttatcgtg atcattaacc tggactct ggcggcagct 240

ctgctgcaca ccaaaacctg gttgaactg gcacggaaag cggccatat cattgtaaaa 300

gacgaaaaaa tggaccaga gccaattatc aaaagtctct gggcggtaac tgtggttgcc 360

accatcgtaa tcctgttgt tgccctgtac tggtaa 396

<210> 94

<211> 119

<212> PRT

<213> 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

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> Escherichia coli

<400> 95

atgattaatc caaatccaaa gcgttctgac gaaccggat tctggggctt cttcgcc 60

ggtgttatgt ggagcgccat cattgcgcgg gtgatgatcc tgctggggg tattctgctg 120

ccactgggt tttccggg tcatgcgcgt agctacgagc gcgttctggc gttcgccag 180

agcttcattt gtcgcgtatt cctgttccgt atgatcgatc tgccgcgtg gtgtggttt 240

caccgtatgc accacgcgat gcacgatctg aaaatccacg tacctgcggg caaatgggtt 300

ttctacggtc tggctgctat cctgacagtt gtcacgctga ttgggtcgtaacaatctaa 360