



(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
부타맥스 어드밴스드 바이오퓨얼스 엘엘씨
미국 19880 델라웨어주 윌밍톤 파우더 밀 로드
200 익스페리멘탈 스테이션 비268/알226
(72) 발명자
그래디, 마이클, 찰스
미국 08107 뉴저지주 오클린 헤더 로드 147
파트나이크, 란잔
미국 19702 델라웨어주 네워크 도널드 프레스톤
드라이브 5
(74) 대리인
김영, 양영준, 양영환

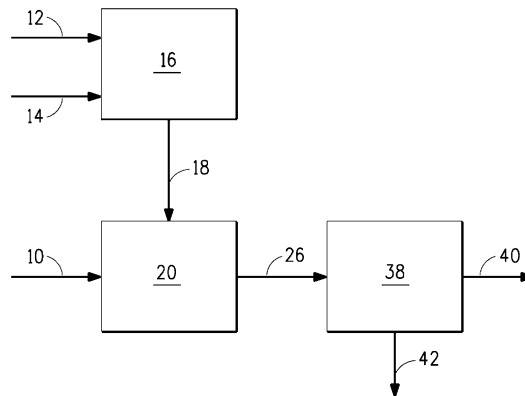
전체 청구항 수 : 총 26 항

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

(57) 요약

부탄올 제조물은, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기 위해 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.

대표도 - 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 아마이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 불수용성 유기 추출용매, 및 임의로 ii) 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 아마이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 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, 포스포늄, 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), 한센울라(Hansenula), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 이삐트첸키아(Issatchenkia) 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 올레에이트, 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-노나날, 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 아마이드, 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 아마이드, 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 아마이드, 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 아마이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 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 아마이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 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.

배경 기술

[0004] 부탄올은 연료 첨가제로서, 디젤 연료에의 블랜드 성분으로서, 플라스틱 산업에서 원료 화학물질로서, 그리고 식품료 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, 회석된 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 회석된 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 회석된 수용액으로부터 C3-C6 알코올을 회수하는 방법을 개시한다. 이 방법은 수용액의 일부분 내에서의 C3-C6 알코올의 활성을, 적어도 그 일부분 내에서의 C3-C6 알코올의 포화 활성까지 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 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 선택되고, 제2 용매는 C_7 내지 C_{11} 알코올, C_7 내지 C_{11} 카르복실산, C_7 내지 C_{11} 카르복실산의 에스테르, C_7 내지 C_{11} 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 생물용화성을 제공하는, 부탄올의 본래 자리에서의 제조물 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 유기상으로부터 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) 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} 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 추출용매와 접촉시켜, 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, 루비등, 세슘, 마그네슘, 칼슘, 스트론튬, 바륨, 암모늄, 포스포늄, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 양이온을 갖는 염을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 전해질은 설페이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 락테이트, 포스페이트, 플루오라이드, 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), 살모넬라(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 피키아(Pichia), 칸디다(Candida), 한센룰라(Hansenula), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 이삿첸키아(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("뉴클레오타이드 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 뉴모니에 budB (<i>Klebsiella pneumoniae</i> budB) (아세트락테이트 합성효소) | 1 | 2 |
| 이. 콜라이) ilvC (아세트하이드록시산 환원이성질화효소(acetohydroxy acid reductoisomerase)) | 3 | 4 |
| 이. 콜라이 ilvD (아세트하이드록시산 탈수효소) | 5 | 6 |
| 락토코커스 락티스 kivD (<i>Lactococcus lactis</i> kivD) (분지쇄 α -케토산 탈카르복실화효소) | 7 (코돈 최적화된 것) | 8 |
| 아크로모박터 자일로속시단스 sadB (<i>Achromobacter</i> <i>xylosoxidans</i> sadB) (부탄올 탈수소효소)(| 9 | 10 |
| 바실러스 서브틸리스 alsS (<i>Bacillus subtilis</i> alsS) (아세트락테이트 합성효소) | 11 | 12 |
| S. 세레비시아 ILV5 (<i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ILV5) (아세트하이드록시산 환원이성질화효소; "KARI") | 13 | 14 |
| 돌연변이체 KARI (Pf5.ilvC- Z4B8 에 의해 인코딩된 것) | 15 | 16 |
| 스트렙토코커스 무탄스 ilvD (<i>Streptococcus mutans</i> ilvD) (아세트하이드록시산 | 17 | 18 |

[0052]

| | | |
|--|-------------------|----|
| 탈수효소) | | |
| 바실러스 서브틸리스 kivD (분지쇄 케토산 탈카르복실화효소) | 19 (코돈 최적화된 것) | 20 |
| 말 간 알코올 탈수소효소(Horse liver alcohol dehydrogenase) (HADH) | 56 (코돈 최적화된 것) | 57 |
| 이. 콜라이 pfIB (피루베이트 포르메이트 리아제) | 71 | 70 |
| 이. 콜라이 frdB (푸마레이트 환원효소 효소 복합체의 하위단위(subunit of fumarate reductase enzyme complex)) | 73 | 72 |
| 이. 콜라이 ldhA (락테이트 탈수소효소) | 77 | 76 |
| 이. 콜라이 adhE (알코올 탈수소효소) | 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 |
|-------------------|-------|
| pRS425::GPM-sadB | 63 |
| GPM-sadB-ADHt 절편 | 21 |
| pUC19-URA3r | 22 |
| 114117-11A | 23 |
| 114117-11B | 24 |
| 114117-11C | 25 |
| 114117-11D | 26 |
| 114117-13A | 27 |
| 114117-13B | 28 |
| 112590-34F | 29 |
| 112590-34G | 30 |
| 112590-34H | 31 |
| 112590-49E | 32 |
| ilvD-FBA1t 절편 | 33 |
| 114117-27A | 34 |
| 114117-27B | 35 |
| 114117-27C | 36 |
| 114117-27D | 37 |
| 114117-36D | 38 |
| 135 | 39 |
| 112590-30F | 40 |
| URA3r2 주형 | 41 |
| 114117-45A | 42 |
| 114117-45B | 43 |
| PDC5::KanMXF | 44 |
| PDC5::KanMXR | 45 |
| PDC5ko for | 46 |
| N175 | 47 |
| pLH475-Z4B8 플라스미드 | 48 |
| CUP1 프로모터 | 49 |
| CYC1 종결자 CYC1-2 | 50 |
| ILV5 프로모터 | 51 |
| ILV5 종결자 | 52 |

[0055]

| | |
|------------------------|----|
| FBA1 프로모터 | 53 |
| CYC1 종결자 | 54 |
| pLH468 플라스미드 | 55 |
| 벡터 pNY8 | 58 |
| GPD1 프로모터 | 59 |
| GPD1 프로모터 단편 | 60 |
| OT1068 | 61 |
| OT1067 | 62 |
| GPM1 프로모터 | 64 |
| ADH1 종결자 | 65 |
| OT1074 | 66 |
| OT1075 | 67 |
| pRS423 FBA ilvD(Strep) | 68 |
| FBA 종결자 | 69 |
| pflB CkUp | 78 |
| pflB CkDn | 79 |
| frdB CkUp | 80 |
| frdB CkDn | 81 |
| ldhA CkUp | 82 |
| ldhA CkDn | 83 |
| adhE CkUp | 84 |
| adhE CkDn | 85 |
| N473 | 86 |
| N469 | 87 |
| N695A | 88 |
| N695B | 89 |

[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 개시문헌에서 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, 현탁된 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 측정되는 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 추출용매로부터 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 생물축매에 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 "생물용화성(biocompatibility) "은 추출용매의 존재 하에 포도당을 이용하는 미생물의 능력의 측정값을 말한다. 생물용화성 추출용매는 미생물이 포도당을 이용할 수 있도록 허용한다. 비-생물용화성(즉, 생물독성의) 추출용매는 예를 들어, 추출용매가 존재하지 않을 때의 속도의 약 25% 초과로 미생물이 포도당을 이용하지 못하도록 한다.
- [0090] 용어 "°C"는 켈시우스 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 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)(미국 버지니아주 마나싸스(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"는 마이크로리터를 의미한다.
- [0103] 용어 "μg"은 마이크로그램을 의미한다.
- [0104] 용어 "μg/ml"는 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 분 당 회전수를 의미한다.
- [0111] 용어 "HPLC"는 고압 액체 크로마토그래피를 의미한다.
- [0112] 용어 "GC"는 기체 크로마토그래피를 의미한다.
- [0113] 본원에서 언급된 모든 공개문헌, 특허, 특허 출원 및 기타 참조문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 표현상으로 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] 부탄올 제조를 위한 미생물 숙주는 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 및 효모로부터 선택될 수 있다. 사용되는 미생물 숙주는 제조되는 부탄올 제조물에 대해 내성이어야 할 것이며, 그래서 수율은 제조물이 숙주에 미치는 독성에 의해 제한되지 않는다. 부탄올 제조를 위한 미생물 숙주의 선택은 하기 상세히 기술된다.
- [0116] 높은 적정 농도 수준의 부탄올에서 대사적으로 활성인 세균은 당업계에 잘 알려져 있지 않다. 부탄올-내성 돌연변이체가 용매제조 클로스트리디아(solventogenic Clostridia)로부터 단리되었지만, 기타 잠재적으로 유용한 박테리아 균주의 부탄올 내성에 관해서는 이용할 만한 정보가 거의 없다. 박테리아 내에서 알코올 내성을 비교한 연구의 대부분은 부탄올이 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-부탄올의 수율이 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(Clostridium acetobutylicum) 내에서의 발효 동안 부탄올 독성에 의해 제한될 수 있는 것으로 보고한다. 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 미치는 1-부탄올의 1차 효과는 막 기능의 붕괴이다(문헌[Hermann et al., Appl. Environ. Microbiol. 50:1238-1243 (1985)]).
- [0117] 부탄올 제조에 선택되는 미생물 숙주는 부탄올에 대해 내성이어야 할 것이고, 하기 기재되는 경로와 같은 도입된 생합성 경로를 사용해 탄수화물을 부탄올로 전환시킬 수 있어야 할 것이다. 적합한 미생물 숙주 선택을 위한 기준에는: 부탄올에 대한 고유 내성(intrinsic tolerance), 높은 속도의 탄수화물 이용, 유전자 조작용 유전적 톨의 이용가능성, 및 안정한 염색체 변형을 발생시키는 능력이 포함된다.
- [0118] 부탄올에 대해 내성이 있는 적합한 숙주 균주는 균주의 고유 내성을 바탕으로 스크리닝함으로써 규명될 수 있다. 세균(microbe)이 부탄올에 대해 갖는 고유 내성은 최소 배지에서 성장될 때 성장 속도를 50% 억제시키는(IC50) 부탄올의 농도를 결정함으로써 측정될 수 있다. IC50 값은 당업계에 알려진 방법을 사용해 결정될 수 있다. 예를 들어, 흥미있는 세균은 다양한 양의 부탄올의 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 부탄올의 농도는 부탄올 농도에 대한(versus) 성장의 억제%의 그래프로부터 결정될 수 있다. 바람직하게는, 숙주 균주는 약 0.5% 초과인 부탄올에 대한 IC50을 가져야 할 것이다. 약 1.5% 초과인, 부탄올에 대한 IC50을 갖는 숙주 균주가 더욱 적합하다. 약 2.5% 초과인, 부탄올에 대한 IC50을 갖는 숙주 균주가 특히 적합하다.
- [0119] 부탄올 제조를 위한 미생물 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 제조합 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] 미생물 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 부탄올 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, 부탄올은 미생물의 주요 제조물이다. 실시 양태에서, 미생물은 아세톤을 제조하지 않는다.

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

[0124] 상기 언급된 미생물은 당업계에 알려진 방법을 사용해, 발효가능한 탄소원을 부탄올, 구체적으로는 1-부탄올, 2-부탄올, 또는 아이소부탄올로 전환시키도록 유전적으로 변형될 수 있다. 적합한 미생물에는 에스케리키아, 락토바실러스, 및 사카로마이세스가 포함된다. 적합한 미생물에는 이. 콜라이, L. 플란타룸 및 S. 세레비시아가 포함된다. 추가로, 미생물은 브람우치 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] 부탄올 제조에 적합한 생합성 경로는 당업계에 알려져 있고, 소정의 적합한 경로는 본원에서 기재된다. 일부 실시 양태에서, 부탄올 생합성 경로는 숙주 세포에 이중성인 적어도 하나의 유전자를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 부탄올 생합성 경로는 숙주 세포에 이중성인 유전자를 하나 초과로 포함한다. 일부 실시 양태에서, 부탄올 생합성 경로는 생합성 경로의 매 단계에 상응하는 폴리펩타이드를 인코딩하는 이중성 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(isomeroeductase)를 기재하고, 2010년 9월 29일에 출원된 미국 출원 일련 번호 제12/893,077호도 마찬가지로; 미국 특허 출원 공보 제20100081154호는 다이하이드록시산 탈수효소를 기재하며; 알코올 탈수소효소는 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 도널드슨(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-부탄올 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-부타논에서 2-부탄올로.

[0140] 미생물은 또한, 아이소부탄올 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 아이소부탄올 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 아이소부탄올 생합성 경로를 포함할 수 있다: 아세토락테이트 합성효소(서열 목록 번호:2로서 주어짐)를 인코딩하는 클레브시엘라 뉴모니에 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 부탄올 탈수소효소(서열 목록 번호:10으로서 주어짐)를 인코딩하는 아크로모박터 자일로속시단스 유래의 sadB(서열 목록 번호:9로서 주어짐). 아이소부탄올 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, 부탄올 탈수소효소는 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, 아이소부탄올 제조를 제한하는 경쟁적 경로를 제거하기 위해 하기 유전자인, (피루베이트 포르메이트 리아제를 인코딩하는) 서열 목록 번호: 71로서 주어지는 pf1B, (락테이트 탈수소효소를 인코딩하는) 서열 목록 번호: 73으로서 주어지는 IdhA, (알코올 탈수소효소를 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 아이소부탄올 생합성 경로를 포함할 수 있다: 아세토락테이트 합성효소(서열 목록 번호:12)를 인코딩하는 바실러스 서브틸리스 유래의alsS 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 ilvD(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 부탄을 탈수소효소(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 제조합 사카로마이세스 세레비시에 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 탈수소효소 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. 이중성 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 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포 및 포스포트랜스아세틸라아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포는 미국 특허 가출원 제61/356379호에서 기재되어 있다.

[0152] 적합한 효모 균주의 구축

[0153] NGI-049는 적합한 사카로마이세스 세레비시에 균주의 한 예이다. NGI-049는 내인성 PDC1, PDC5, 및 PDC6 유전자의 삽입-불활성화를 갖고 있고, 발현 벡터 pLH475-Z4B8 및 pLH468을 함유하는 균주이다. PDC1, PDC5, 및 PDC6 유전자는 피루베이트 탈카르복실화효소의 3개의 주요 아이소자임(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 붕괴로 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, 호호만(Hohmann)에서 조절 유전자의 붕괴(문헌[Mol Gen Genet. (1993) 241:657-666])에 대해 보고되었다. 피루베이트 탈카르복실화효소 활성이 없는 사카로마이세스 균주는 ATCC(수탁 번호 #200027 및 #200028)로부터 입수가능하다.

[0156] pdc6::GMP1-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::GMP1p-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℃에서 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 합입을 입증하였다. 표준 프로토콜에 따라, 30℃에서 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.

[0159] pdc1::PDC1-ilvD 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 ilvD-FBA1t 절편(서열 목록 번호: 33)을 pUC19-URA3r 유래의 URA3r 유전자에 연결시켜, pdc1::PDC1p-ilvD-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℃에서 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 PC에 의해 형질전환체를 스크리닝하여, PDC1 코딩 영역이 결실된 PDC1 좌(locus)에서의 합입을 입증하였다. 표준 프로토콜에 따라, 30℃에서 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::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t를 갖는다.

[0162] HIS3 결실

[0163] 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 프라이머의 HIS3 부위를 HIS3 프로모터의 5' 업스트림 영역 및 코딩 영역의 3' 다운스트림 영역으로부터 유도하여서, URA3r2 마커의 합입이 HIS3 코딩 영역을 대체하게 하였다. 표준 유전자 기술을 사용해 PCR 제조물을 NYLA67로 형질전환시켰고(문헌[Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202]), 30℃에서 우라실이 결여되어 있고 2% 포도당이 보충된 합성 완전 배지 상에서 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체를 스크리닝하여, 30℃에서 히스티딘이 결여되어 있고 2% 포도당이 보충된 합성 완전 배지 상으로 형질전환체를 레플리카 플레이팅(replica plating)하여 올바른 합입을 입증하였다. 표준 프로토콜에 따라, 30℃에서 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

pd6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3을 갖는다.

[0164]

pd5::kanMX 통합 카세트의 구축 및 PDC5 결실:

[0165]

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 삽입이 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℃에서 1% 에탄올 및 제네티신(geneticin)(200μg/ml)이 보충된 YP 배지 상에서 형질전환체를 선별하였다. 형질전환체를 PCR에 의해 스크리닝하여, 프라이머 PDC5koFor 및 N175(서열 목록 번호: 46 및 47)를 사용하여 PDC5 코딩 영역이 대체된 PDC 좌에서의 올바른 삽입을 입증하였다. 규명된 올바른 형질전환체는 유전자형: BY4700 pd6::GPM1p-sadB-ADH1t pdc1::PDC1p-ilvD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4를 갖는다.

[0166]

pLH475-Z4B8 구축

[0167]

효모 내에서의 ALS 및 KARI 발현을 위해 pLH475-Z4B8 플라스미드(서열 목록 번호:48)를 구축하였다. pLH475-Z4B8은 하기 키메라 유전자를 함유하는 pHR81 벡터(ATCC #87541)이다:

[0168]

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

[0169]

2) ILV5 프로모터(서열 목록 번호:51), Pf5.IlvC-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. 세레비시에 KARI 코딩 영역(ILV5; 서열 목록 번호: 13; 단백질 서열 목록 번호:14), 및 CYC1 종결자(서열 목록 번호: 54).

[0170]

Pf5.IlvC-Z4B8 코딩 영역은 미국 특허 출원 공보 제US20090163376호에서 기재된, 슈도모나스 플루오레스센스(Pseudomonas fluorescens) 유래의 KARI를 인코딩하나 돌연변이를 함유하는 서열이다. Pf5.IlvC-Z4B8에 의해 인코딩된 KARI(서열 목록 번호:16)는 천연 슈도모나스 플루오레스센스 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 세레비시에 내에서의 발현에 대해 최적화된 코돈을 바탕으로 한 DNA 2.0(미국, 캘리포니아주, 팔로알토(Palo Alto, CA) 소재; 서열 목록 번호:15)에 의해 Pf5.IlvC-Z4B8 코딩 영역을 합성하였다.

[0181]

발현 벡터 pLH468

[0182]

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

[0183]

B. 서브틸리스 케토아이소발레레이트 탈카르복실화효소(KivD) 및 말 간 알코올 탈수소효소(HADH)를 위한 코딩 영역은 사카로마이세스 세레비시에에서의 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 자일로숙시단스의 부탄올 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::GMP-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-GMP-sadB-NheI를 발생시켰다. pRS425::P_{GPM1}-sadB-NheI는 NheI 및 PacI를 사용해 분해되어, sadB 코딩 영역을 떼어 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 아이소부탄올 경로에 있는 모든 3개의 유전자: ilvD, kivDy 및 Hadhy에 대한 공동발현 벡터를 발생시키기 위해, 본 발명자들은 미국 특허 출원 제12/569636호에서 기재된 pRS423 FBA ilvD(Strep)(서열 목록 번호:68)를 IlvD 유전자의 공급원으로서 사용하였다. 이 서열 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 ilvD 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, ilvD 코딩 영역(nt 4829 내지 4849)에 융합되는 루미오 태그(lumio tag)가 존재한다.

[0187] 제1 단계는, pRS423 FBA ilvD(Strep)(또한,pRS423-FBA(SpeI)-IlvD(스트렙토코커스 뮤탄스)-Lumio라고 불림)를 SacI 및 SacII(T4 DNA 폴리머라아제를 사용해 SacII 부위가 블런트 말단된 것)로 선형으로 만들어서, 총 길이가 9,482bp인 벡터를 제공하는 것이었다. 제2 단계는, SacI 및 KpnI(T4 DNA 폴리머라아제를 사용해 KpnI 부위가 블런트 말단된 것)로 pLH441로부터 kivDy-hADHy 카세트를 단리하여, 6,063bp 단편을 제공하는 것이었다. 이 단편을 pRS423-FBA(SpeI)-IlvD(스트렙토코커스 뮤탄스)-Lumio 유래의 9,482bp 벡터 단편과 연결하였다. 이는 벡터 pLH468(pRS423::P_{FBA1}-ilvD(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-ilvD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4에 동시에 형질전환시켰고, 생성 균주를 30°C에서 히스티딘 및 우라실 결여되고, 1% 에탄올이 보충된 합성 완전 배지 상에 유지시켰다. 생성 균주를 NGI-049라고 명명하였다.

[0189] 유기 추출용매

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

발효용 이상적인 용매의 기준을 충족해야 할 것이다. 구체적으로는, 추출용매는 (i) 미생물, 예를 들어 에스케리키아 콜라이, 락토바실러스 플란타룸, 및 사카로마이세스 세레비시애와 생물용화성이고, (ii) 발효 배지와는 실질적으로 비혼화성이고, (iii) 부탄올 추출을 위해 높은 분배 계수(K_p)를 갖고, (iv) 영양분의 추출을 위해 낮은 분배 계수를 갖고, (v) 발효 배지와 함께 에멀전을 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 부탄올의 다운스트림 분리에 적합한 비등점을 가져야 할 것이다.

[0191] 한 실시 양태에서, 추출용매는 미생물과 생물용화성일 수 있는데, 즉, 미생물에 대해 비독성이거나 미생물이 허용가능한 수준으로 손상될 정도로만 독성이어서, 미생물이 계속해서 부탄올 제조물을 발효 배지 내로 제조한다. 추출용매의 생물용화성의 범위는 정의된 발효 조건 하에서 측정되는 바와 같이, 추출용매 및 부탄올 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. 생물용화성 추출용매는 미생물이 포도당을 이용하게 하는 한편, 비-생물용화성 추출용매는, 미생물이 포도당을 예를 들어, 추출용매가 존재하지 않을 때의 속도의 약 25% 초과 속도로는 이용하지 못하게 한다. 발효 제조물 부탄올의 존재가 추출용매에 대한 미생물의 민감성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 발효 제조물은 추출용매의 생물용화성 테스트 동안에 존재해야 할 것이다. 추가의 발효 제조물, 예를 들어 에탄올의 존재는 추출용매의 생물용화성에 유사하게 영향을 미칠 수 있다. 생물용화성 추출용매의 사용은, 미생물을 포함하는 발효 브로스를 유기 추출용매와 함께 접촉시킨 후에 부탄올을 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 올레에이트, 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(ISOFA[®] 12)(미국 텍사스주 휴스턴(Houston, TX) 소재의 사솔(Sasol)) 또는 자콜 I-12(Jarcol I-12)(미국 뉴저지주 뉴웁(Newark, NJ) 소재의 자켄 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 올레에이트, 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 생물용화성과 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, 이들 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 화합물의 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 부탄올 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 스팅스(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 설페이트, 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 부탄올 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 생물용화성을 나타내는 전해질 농도의 범위가 또한 측정된다. 다음, 적합한 전해질 농도의 범위는 이들 2개의 범위의 중복으로부터 선택되어, 부탄올 분배 계수에 대해 긍정적인 효과를 갖는데 필요한 전해질의 양은 미생물과 허용가능한 수준의 생물용화성을 제공하는 농도 범위와 균형을 이룬다. 경제적인 고려사항이 또한, 사용될 삼투물질의 양을 선택하는 요소일 수 있다.

[0203] 한 실시 양태에서, 전해질은 미생물과 생물용화성인, 즉 미생물에 대해 비독성이거나, 또는 미생물이 허용가능한 수준으로 손상될 범위로만 독성인 농도로 발효 배지 내에 존재할 수 있어서, 미생물은 계속해서 전해질의 존재 하에 부탄올 제조물을 발효 배지 내로 제조한다. 전해질의 생물용화성의 범위는 본원 하기의 실시예 2에서 기재된 바와 같이 다양한 농도의 전해질의 존재 하에 미생물의 성장 속도에 의해 측정될 수 있다. 생물용화성의 전해질 농도는 미생물이 포도당(또는 다른 탄소원)을 이용하게 하거나 또는 성장하게 하는 한편, 비-생물용화성의 전해질 농도는 예를 들어 과량의 전해질이 존재하지 않을 때, 성장 속도의 약 25% 초과 속도로는 성장하지 않게 하거나 포도당(또는 다른 탄소원)을 이용하지 못하게 한다. 발효 제조물, 예를 들어 부탄올의 존재는 또한, 미생물과 생물용화성을 갖는 전해질의 농도 범위에 영향을 미칠 수 있다. 생물용화성을 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 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 전해질의 발효 배지 내에서의 농도를 달성하기 위해서, 전해질은 발효 배지에, 또는 미생물의 성장기 동안에, 부탄올 농도가 억제성일 때 부탄올 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 부탄올을 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 혐기성 조건에 대한 필요 사항을 고려해야 한다. 사용되는 발효 배지는 중요하지 않지만, 사용되는 미생물의 성장을 지지하고 목적하는 부탄올 제조물을 제조하는데 필요한 생합성 경로를 촉진시켜야 한다. 효모 추출물 또는 펩톤과 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 펩톤, 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 부탄올을 회수하는 방법

[0209] 부탄올은 부탄올, 물, 기본 발효 배지의 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 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 부탄올을 제조할 수 있다. 그러한 유전자 변형 미생물은 박테리아, 시아노박테리아, 사상 진균 및 효모로부터 선택될 수 있고, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이, 락토바실러스 플란타룸, 및 사카로마이세스 세레비시애를 포함한다. 과정 중의 한 단계는 발효 배지를 제1 불수용성 유기 추출용매 및 임의로 제2 불수용성 유기 추출용매와 접촉시켜, 수성상 및 부탄올-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, 부탄올-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 부탄올 수준이 이미 선택된 수준에 도달할 때에, 예를 들어 부탄올 농도가 독성 수준 또는 억제성 수준에 도달하기 전에, 발효 배지와 접촉할 수 있다. 부탄올 농도는 기체 크로마토그래피 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같이 당업계에 알려진 방법을 사용해 발효 동안에 모니터링될 수 있다. 전해질은 부탄올 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 가출원 제61/368429호 및 제61/379546호에서 기재된 과정과 함께 사용될 수 있으며, 여기서 부탄올은 리파아제와 같은 촉매를 사용해 지방산과 같은 유기산을 이용해 에스테르화되어 부탄올 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 부탄올 생합성 경로의 발현을 유도할 수 있고, 발효 조건은 미세호기성이나 혐기성 조건으로 전환되어 부탄올 제조를 자극한다. 추출용매는 미세호기성이나 혐기성 조건으로 전환된 후에 첨가될 수 있다. 전해질은 미세호기성이나 혐기성 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, 배지 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, 부탄올 제조물은 유기 추출용매 내로 분배되어서, 미생물을 함유하는 수성상 내에서의 농도를 감소시켜서, 제조 미생물이 억제성 부탄올 제조물에 노출되는 것을 제한한다. 사용되는 유기 추출용매의 부피는 하기 기재된 바와 같이, 발효 배지의 부피, 발효기의 크기, 부탄올 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 부탄올 제조 미생물의 성장 특성에 미치는 첨가되는 전해질의 효과, 및 2-상 발효에서 부탄올의 Kp에 미치는 첨가되는 전해질의 효과를 비롯한 많은 요소에 좌우된다. 첨가되는 전해질의 최적량은 초기 기본 발효 배지의 조성에 좌우될 수 있다. 전해질의 농도가 너무 높으면, 부탄올의 Kp를 증가시키고 미생물에 미치는 부탄올의 독성 효과를 완화시키는 것이 가능하더라도, 그 자체가 미생물에 억제성일 수 있다. 다른 한편으로는, 전해질의 농도가 너무 낮으면, 부탄올의 Kp를 증가시키지 않아서 미생물에 미치는 부탄올의 억제성 효과를 충분히 완화시킬 것이다. 따라서, 과량의 전해질을 발효 배지에 첨가하는 순수한 효과가 부탄올 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 내삼투압물질(osmoprotectant) 또는 삼투물질을 첨가함으로써, 미생물에 대한 염의 생물용화성을 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 부탄올 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 부탄올의 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 부탄올의 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 부탄올-함유 유기상을 수성상으로부터 임의로 분리하는 것이다.

[0218] 부탄올-함유 유기상으로부터 부탄올을 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 부탄올-함유 유기상으로부터 부탄올을 회수하는데 사용될 수 있다. 추출용매는 부탄올 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 염 농도의 존재 하에서의 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기에 적어도 충분한 농도를 제공할 수 있다.

[0220] 기체 스트라이핑은 전해질의 첨가 및 유기 추출용매와 동시에 사용되어서, 발효 배지로부터 부탄올 제조물을 제거할 수 있다. 기체 스트라이핑은 공기, 질소 또는 이산화탄소와 같은 기체를 발효 배지에 통과시킴으로써 수행되어, 부탄올-함유 기체상을 형성할 수 있다. 부탄올 제조물은 부탄올을 농축시키기 위해 냉수 트랩(chilled water trap)을 사용하거나 또는 기체상을 용매로 문지르는 것과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용해 부탄올-함유 기체상으로부터 회수될 수 있다.

[0221] 발효 진행이 완료된 후에 발효 배지에 남아 있는 임의의 부탄올은 신선한 또는 재활용된 유기 추출용매를 사용한 계속되는 추출에 의해 회수될 수 있다. 대안적으로, 부탄올은 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 부탄올 분배 계수를 추가로 증가시키고 부탄올 회수의 효율을 개선시킬 수 있다.

[0222] 2-상 추출성 발효 방법은 교반된 탱크 발효기에서 연속 방식으로 수행될 수 있다. 이 방식에서, 발효 배지 및 부탄올-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 부탄올 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, 부탄올 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. 예는 예를 들어, 미국 특허 제4,865,973호에서 콜레럽(Kollerup) 등에 의해 기재된다.

[0223] 배치식 발효 방식이 또한 사용될 수 있다. 당업계에 잘 알려진 배치 발효는, 발효 배지의 조성이 발효의 시작시에 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 부탄올 제조물의 농도를 최소화시키기 위해서는 더 큰 부피의 유기 추출용매가 필요하다. 결과적으로, 발효 배지의 부피는 더 적고, 제조되는 제조물의 양은 연속 방식을 사용하여 획득되는 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, 부탄올 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 부탄올 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 부탄올 제조물의 제거를 위해 처리될 수 있다. 유사하게는, 분리된 세포가 또한 발효기로 재활용될 수 있다. 부탄올 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.

[0226] 첨가되는 전해질과 함께 추출성 발효를 사용하여 부탄올을 제조하는 방법

[0227] 적어도 하나의 발효가능한 탄소원으로부터 생합성 경로를 통해 부탄올을 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 부탄올 분배 계수에 비해 부탄올 분배 계수를 증가시키기 위해 적어도 충분한 농도로 적어도 하나의 전해질을 추가로 포함하는, 개선된 부탄올 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 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 아마이드, 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 임의의 제2 불수용성 유기 추출용매는 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 아마이드, 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 억제될 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 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 아마이드, 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 아마이드 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 사용하여 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 초과와 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, 용기(116)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 염 농도의 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 혼합물이 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 염 농도의 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). 임의로 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 염 농도의 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 펄핑으로 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 미생물은 연속 루프에서 발효기(F101)로 진행된 다음, 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 부탄올 농도에서 가장 풍부한 추출성 용매 스트림을 이용할 수 있고, 가장 낮은 브로쓰 상 적정 농도에서 작동되는 발효기는 부탄올 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 부탄올 브로쓰 상 (B) 적정 농도에서 작동하는 경우를 고려하면, 발효기(F101)는 상대적으로 온화한 부탄올 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 발효의 중간에 있고, 발효기(F102)는 상대적으로 높은 부탄올 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 부탄올 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 밸브는 가장 낮은 부탄올 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 부탄올 브로쓰 상 적정 농도에서 작동하는 그의 발효의 중간에 있으며, 그리고 (c) 발효기(F101)가 상대적으로 더 높은 부탄올 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 오랫동안 그리고 가능한 한 낮은 브로쓰 상 부탄올 적정 농도를 유지하는 것일 수 있다. 추가로, 더 높은 부탄올 브로쓰 상 적정 농도에서 작동되는 발효 내로 추가로 가공되는 다른 발효기의 온도를 하락시키는 것이 가능할 수 있다. 온도의 하락은 더 높은 부탄올 브로쓰 상 적정 농도에 대한 개선된 내성을 허용할 수 있다.

[0244] 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 CO₂를 제공하고 SO_x나 NO_x는 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 가용성을 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. 이들 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 취득하였고, 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 취득하였고, 추가의 정제 없이 사용하였다. 황산나트륨(Na_2SO_4 , CAS 7757-82-6, 99% 초과 순도)을 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 취득하였다. 염화나트륨(NaCl , CAS 7647-14-5, 공업용 등급)을 EMD 케미칼즈, 인코포레이티드(EMD Chemicals, Inc.)(미국 뉴저지주 깁스타운(Gibbstown, NJ))로부터 구매하였다.
- [0254] 일반 방법
- [0255] 미생물 세포 농도를 측정하기 위한 광학 밀도 판독을 서모 일렉트론 코포레이션 헬리오스 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 어널리라이저(2700 Select Biochemistry Analyzer)(미국 오하이오주 옐로우 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. 어널리라이저는 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 어널리라이저 규격은 하기와 같았다:
- [0257] 샘플 크기: 15 μl
- [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 헤쿨스(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 μm 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 μl
- [0262] 유속: 0.60ml/분
- [0263] 진행 시간: 40 분
- [0264] 칼럼 온도: 40 $^{\circ}\text{C}$
- [0265] 검출기: 굴절률
- [0266] 검출기 온도: 35 $^{\circ}\text{C}$
- [0267] UV 검출: 210nm, 8nm 대역폭
- [0268] 진행 후에, 샘플 내의 농도를 화합물의 각각에 대한 표준 곡선으로부터 측정하였다. 체류 시간은 아이소부탄올

및 포도당에 대해 제각기 32.6분 및 9.1분이었다.

- [0269] 유기 추출용매 상 내의 아이소부탄올 및 에탄올을 하기 기재된 바와 같은 기체 크로마토그래피(GC)를 사용해 측정하였다.
- [0270] 하기 GC 방법을 사용하여, 유기상 내의 아이소부탄올 및 에탄올의 양을 측정하였다. GC 방법은 아질런트 테크놀로지스(미국, 캘리포니아주, 산타 클라라 소재)의 J&W 사이언티픽 DB-와세트르 칼럼(J&W Scientific DB-WAXETR column)(50m x 0.32mm ID, 1 μ m 필름)을 이용하였다. 담체 기체는 일정 헤드 압력을 이용해 4ml/분의 유속에서의 헬륨이었고; 주입기 스플릿(injector split)은 250℃에서 1:5이었고; 오븐 온도는 5분 동안 40℃, 10℃/분으로 40℃에서 230℃로, 그리고 5분 동안 230℃였다. 불꽃 이온화 검출을 40ml/분 헬륨 구성 기체와 함께 250℃에서 사용하였다. 주입 전에, 배양 브로쓰 샘플을 원심분리하였다. 주입 부피는 1.0 μ l였다. 보정된 표준 곡선이 에탄올 및 아이소부탄올에 대해 발생하였다. 이들 조건 하에, 아이소부탄올 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 제네틱스(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 파쇄물을 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 μ g/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 형질전환시킴으로써 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 100 μ g/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트 위에 퍼서 발랐다.
- [0281] 균주 JW0886(Δ pflB::kan)을 플라스미드 pCP20으로 형질전환시켰고, 100 μ g/ml 앰피실린이 든 LB 플레이트 상에 30℃에서 퍼서 발랐다. 다음, 앰피실린 내성 형질전환체를 선택하였고, LB 플레이트 상에서 스트레이킹

(streaking)을 하였고, 42℃에서 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} 파쇄물로 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℃에서 퍼서 발랐고, 다음, 앰피실린 내성 형질전환체를 선별하였고, LB 플레이트 상에 스트레이킹하였고, 42℃에서 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} 파쇄물로 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℃에서 퍼서 발랐고, 앰피실린 내성 형질전환체를 LB 플레이트 상에 스트레이킹하였고 42℃에서 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} 파쇄물로 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℃에서 퍼서 발랐고, 앰피실린 내성 형질전환체를 LB 플레이트 상에서 스트레이킹하였고 42℃에서 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 자일로숙시단스 유래의 부탄을 탈수소효소인 sadB를 인코딩하는 DNA 단편(DNA 서열 목록 번호:9; 단백질 서열 목록 번호: 10)을 표준 조건을 사용하여 A. 자일로숙시단스 게놈 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)(인비트로젠(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::sadB를 EcoRI으로 분해하였고, sadB 단편을 방출시켰고, 이것을 EcoRI-분해된 pTrc99a와 연결해서 pTrc99a::sadB를 발생시켰다. 이 플라스미드를 이. 콜라이 마치 1 세포 내로 형질전환시켰고, 생성 형질전환체를 Mach1/pTrc99a::sadB라고 명명하였다. 이들 세포 내에서 sadB 유전자로부터 발현되는 효소의 활성은, 아이소부티랄데하이드를 표준물질로 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-kivD는 아이소부탄올 발현용 오페론을 갖고 있는 pTrc-99a 발현 벡터이다(미국 특허 출원 공보 제20070092957호의 실시예 9 내지 14에서 기재됨). pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD 아이소부탄올 오페론 내의 제1 유전자는 클레브시엘라 뉴모니아 ATCC 25955 유래의 아세트락테이트 합성효소를 인코딩하는 budB 이고, 이어서 이. 콜라이 유래의 아세트하이드록시산 환원이성질화효소를 인코딩하는 ilvC 유전자이다. 이것 다음에, 이. 콜라이 유래의 아세트하이드록시산 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::sadB로부터 sadB 코딩 영역을 증폭시켰다. 98℃에서 1분 동안의 초기 변성, 및 이어서 98℃에서 10초 동안의 변성, 62℃에서 30초 동안의 어닐링, 72℃에서 20초 동안의 신장의 30 사이클, 및 72℃에서 5분 동안의 최종 신장 사이클, 및 이어서 4℃에서 유지시켜서 증폭을 수행하였다. 프라이머 N695A는 클로닝을 위한 AvrII 제한 부위, 및 sadB 코딩 영역의 ATG 개시 코돈의 RBS 업스트림을 함유하였다. N696A 프라이머는 클로닝용 XbaI 부위를 포함하였다. 1.1kb PCR 제조물을 AvrII 및 XbaI(미국 마이애미주 베버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스)로 분해하였고, 젤을 키아퀵 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-kivD와 함께 연결하였다. 연결 혼합물을 16 °C에서 밤새 인큐베이션시킨 다음, 제조업자의 프로토콜에 따라 이. 콜라이 마치(Mach) 1™ 컴피턴트 세포(인비트로젠) 내로 형질전환시켰다. 형질전환체를 100µg/ml 앰피실린이 든 LB 아가(agar) 상에서 성장시킨 후 수득하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 키아프랩 스핀 미니프랩 키트(QIAprep Spin Miniprep Kit)(미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 키아젠 인코포레이티드)를 사용해 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 제조하였다. 생성 플라스미드를 pTrc99A::budB-ilvC-ilvD-kivD-sadB라고 불렀다.
- [0290] 4KO 균주용 일렉트로컴피턴트 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-sadB를 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 아이소부탄올의 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] [표 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 모노하이드레이트 | 1.7 | 8.09 |
| 마그네슘 셀레이트 헵타하이드레이트 | 2.0 | 8.11 |
| 미량 원소 (mL/L) | 10.0 | -- |
| 티아민 하이드로클로라이드 (mg/L) | 4.5 | -- |
| 효모 추출물 | 5.0 | -- |
| 시그마 소포제 204 (mL/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℃ 내지 60℃로 가열한다. 다른 성분이 용액 내에 있는 후에, 페릭(ferric) 시트레이트를 서서히 첨가하였다. 0.2마이크론 필터를 사용해 용액을 여과 멸균하였다.

EDTA 0.84 g/L
(에틸렌다이아민테트라 아세트산)

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

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

쿠프릭(Cupric) 클로라이드 다이하이드레이트 0.15 g/L

붕산 (H₃BO₃) 0.30 g/L

나트륨 불리브테이트 다이하이드레이트 0.25 g/L

아연 아세테이트 다이하이드레이트 1.30 g/L

페릭 시트레이트 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 셀레이트 헵타하이드레이트의 합)의 초기 수준은 약 144.2mM인 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]

하기 실험 절차를 사용하여, 표 3 및 4의 데이터를 발생시켰다. 이들 K_p 측정 실험에서, 황산나트륨(Na₂SO₄) 또

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 셰이커(미국 뉴저지주 에디슨(Edison, NJ) 소재의 뉴 브런스윅 사이언티픽(New Brunswick scientific)의 이노바 4230(Innova 4230))에서 250RPM으로 셰이킹하면서 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 셰이킹 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 [아이소부탄올]_{유기상} / [아이소부탄올]_{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) 물/L (a) | BFM에 첨가되는 황산나트륨 Na_2SO_4 의 양 (물/L) (b) | 실험에서 염의 총 양 물/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) 물/L (a) | BFM에 첨가되는 염화나트륨 NaCl의 양 (물/L) (b) | 실험에서 염의 총 양 물/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 NaCl을 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 셰이커(Innova table top shaker) 내, 30°C , 250RPM에서 셰이크 플라스크 내에 0.31g/L의 베타인 하이드로클로라이드 및 상이한 수준의 Na_2SO_4 (0g/L 내지 284g/L)가 보충된 BFM 배지 내에서 4KO 이. 콜라이 균주를 성장시켰다. 냉동된 바 이알에서, 25ml의 종 배양물(seed culture)을, 30°C , 200RPM에서 BD 레버러토리즈(BD Laboratories)(미국, 메릴랜드주, 스팅스, 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 셰이크 플라스크에 첨가하였다. 샘플을 정해진 시점에서 제거하여, OD_{600} 에 의해 측정된 바와 같이 바이오매스(biomass) 성장을 모니터링하였다. 지수 성장 속도 방정식을 맞춤으로써(fitting) 바이오매스 시간 프로파일로부터 성장 속도를 계산하였다.

[0309] [표 5]

| 4KO 이. 콜라이 균주의 성장 속도에 미치는 Na_2SO_4 의 효과 | | | |
|---|--|---------------------------|---|
| BFM 내 염의 총 초기 농도 (표 2) 몰/L (a) | BFM 에 첨가되는 Na_2SO_4 의 농도 (몰/L) (b) | 실험에서 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, 아이소부탄올 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 루리아-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 (표 10에 제공된 조성물) | 1.00 ml | NA |
| 포타슘 포스페이트 일염기성 | 1.40 g | 10.30 |
| 시트르산 모노하이드레이트 | 2 g | 9.50 |
| 마그네슘 설페이트, 헵타하이드레이트 | 2 g | 8.10 |
| 페릭 암모늄 시트레이트 | 0.33 g | 1.25 |
| 염화칼슘, 2 수화물 | 0.20 g | 1.36 |
| 효모 추출물 ^a | 5.00 g | |
| 소포제 204 ^b | 0.20 ml | |
| 베타인 하이드로클로라이드 | 0.32 g | |
| 티아민스 (Thiamince)·HCl, 5g/L 스톡 (stock) | 1.00 ml | |
| 엠펙실린, 25 mg/ml 스톡 | 4.00 ml | |
| 포도당 50 중량% 스톡 | 33.3 ml | |

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

^b시그마-알드리치로부터 수득

[0317]

[0318] [표 7]

| 발치의 개질된 미량 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 |
| 붕산 (H ₃ BO ₃) | 0.1 |
| 소듐 몰리브데이트 (NaMoO ₄ ·2H ₂ O) | 0.1 |

[0319]

[0320] 표 6의 성분 1 내지 11을 처방된 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. 엠펙실린, 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 오토클레이브가능한 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℃에서 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 0.13slpm으로 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 아이소부탄의 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 이룰 수 있게 하기 위해서는 아이소부탄의 효율적인 제조가 미세호기성 조건을 필요로 하기 때문에, 0.3vvm에서 공기를 계속해서 발효기에 공급하였다. 지속적인 에어레이션(aeration)은 발효기의 수성상으로부터 아이소부탄을 유의하게 스트라이핑하였다. 스트라이핑으로 인한 아이소부탄의 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 아이소부탄의 양을 정량하였다. 74 또는 42의 질량 대 충전비에서 아이소부탄을 피크를 계속해서 모니터링하여, 기체 스트림 내의 아이소부탄의 양을 정량하였다.

[0323] 아이소부탄을 제조에 대해, 스트라이핑으로 인해 소실된 아이소부탄에 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 아이소부탄을 측정하였다. 본원 상기에서 기재된 GC 방법을 사용해 올레일-알코올 추출용매 상 내의 아이소부탄을 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 부탄올을 제조하는 생물축매의 대사에 유해한 효과를 가질 수 있었을 뿐만 아니라, 염 첨가 조절이 없는 경우와 비교해 부탄올의 Kp를 증가시킴으로써 부탄올의 억제 효과를 완화시킬 수 있었다. 본 발명자들의 2-상 추출성 시스템에 염을 첨가하는 순수한 효과는 부탄올의 증가된 제조 및 회수를 선호한다.

[0325] [표 8]

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

| 표 6에서 발효 배지에 첨가되는 Na ₂ SO ₄ 농도 (볼/L) | 실험에서 염의 총 양 (표 6 + Na ₂ SO ₄) 볼/L | 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 |

[0326] 발효 배지 내 염의 초기 양(표 6)은 약 0.05볼/L였다.

[0327] 실시예 4

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

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

[0330] [표 9]

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

| 표 6에서 발효 배지에 첨가되는 Na_2SO_4 농도 (몰/L) | 실험에서 염의 총 양 (표 6 + Na_2SO_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]

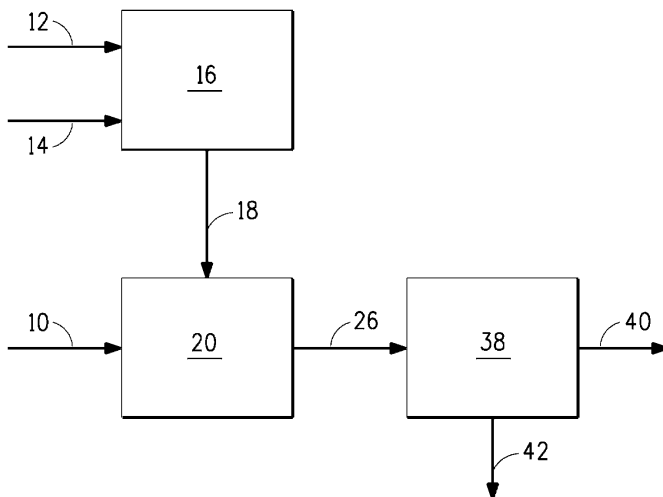
[0331]

[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 부탄올의그램(g)은 전해질을 첨가하지 않는 경우와 비교해 염의 존재 하에 거의 2배 더 높다.

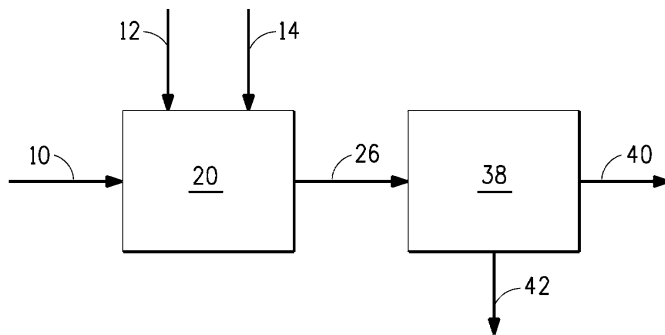
[0333] 본 발명의 특정 실시 양태가 전술한 상세한 설명에서 기재되었지만, 당업자는 본 발명의 취지나 필수 부분(attribute)을 벗어나지 않으면서 본 발명이 많은 변형, 치환 및 재배열을 받을 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 취지를 나타내는 바와 같이, 전술한 명세서보다는 첨부된 청구항을 참조해야 할 것이다.

도면

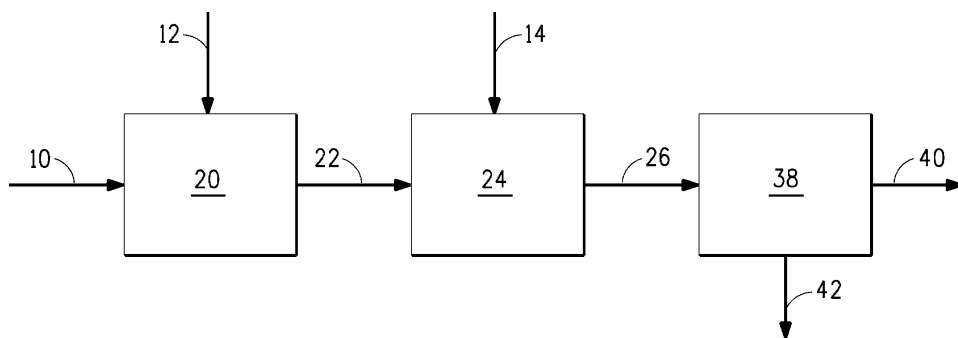
도면1



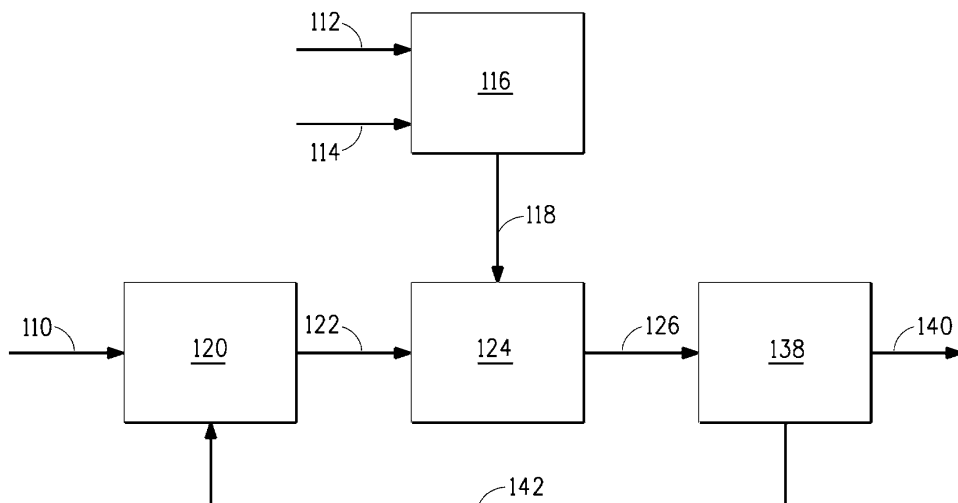
도면2



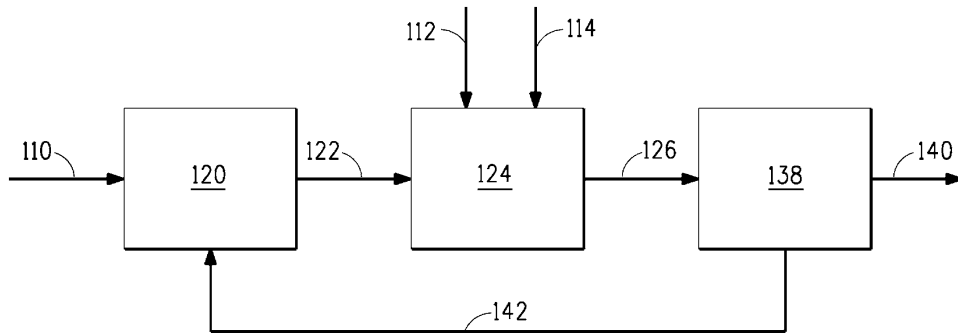
도면3



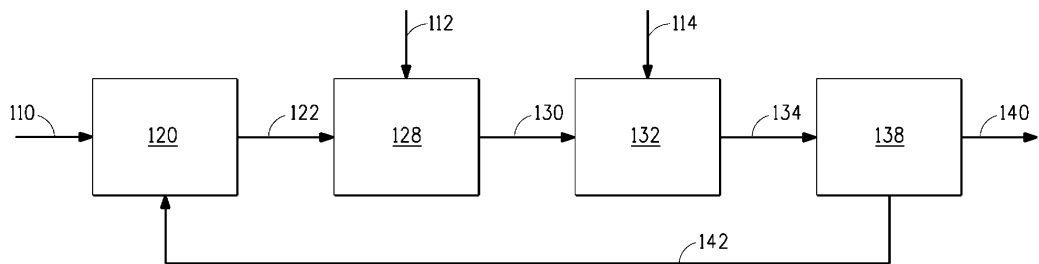
도면4



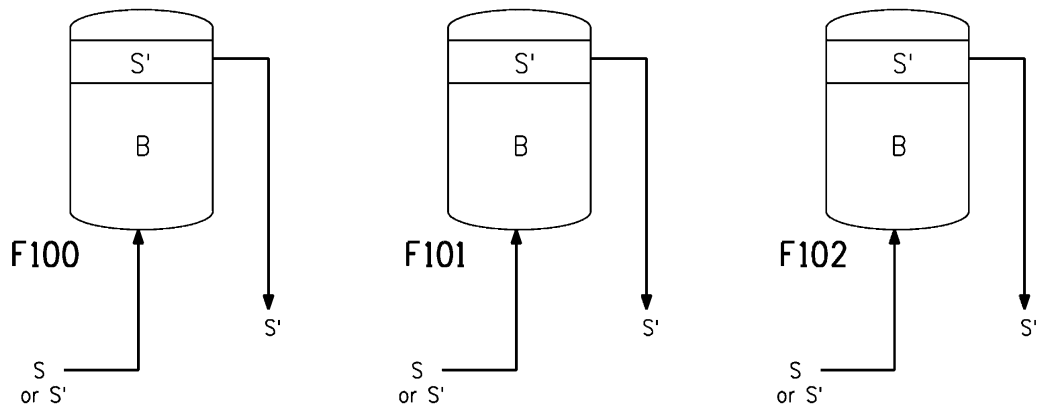
도면5



도면6



도면7



서열 목록

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 agtatccggt acgccagtgg ggcacggcg ccatctcgt cgtcagtcag | 60 |
| ctggaagctc agggagtagc ccaggtgttc ggcatccccg gcgcaaaat cgacaaggctc | 120 |
| tttgattcac tgctggattc ctccattcgc attattccgg tacgccacga agccaacgcc | 180 |
| gcatttatgg ccgcccgct cgagcgcatt accggcaaag cggcggtggc gctggtcacc | 240 |
| tccggtccgg gcgtttcaa cctgatcacc ggcatggcca ccgcaacag cgaaggcgac | 300 |
| ccggtggtgg ccttggcgcg cgcggtaaaa cgcccgata aagcaagca ggtccaccag | 360 |
| agtatggata cggtagcgat gttagcccg gtcaccaaat acgcatcga ggtgacggcg | 420 |
| ccgtagcgcg tggcggaagt ggtctccaac gccttcgcg ccgccgagca gggccggccg | 480 |
| ggcagcgcg tcttagcct gccgcaggat gtggtcgatg gcccggtcag cggcaaagt | 540 |
| ctgccggcca gggggcccc gcagatgggc gccgcgccgg atgatgcat cgaccagggtg | 600 |
| gcgaagctta tcgccaggc gaagaaccg atcttcctgc tcggcctgat ggccagccag | 660 |
| ccggaataca gcaaggcgt cgccggtttg ctggagacca gccatattcc agtcaccagc | 720 |
| acctatcagg ccgccggagc ggtgaatcag gataacttct ctgcttcgc cggccgggtt | 780 |
| gggctgttta acaaccaggc cggggaccgt ctgctgcagc tcgccgacct ggtgatctgc | 840 |
| atcggtaca gcccggtgga atacgaaccg gcgatgtgga acagcggcaa cgcgacgctg | 900 |
| gtgcacatcg acgtgctgcc cgcctatgaa gagcgcaact acaccccgga tgtcgagctg | 960 |
| gtggcgata tcgccggcac tctcaacaag ctggcgaaa atatcgatca tcggctggtg | 1020 |
| ctctccccgc aggcggcgga gatctccgc gaccgccagc accagcgca gctgctggac | 1080 |
| cgccgcggcg cgcagctcaa ccagtttgc ctgcatcccc tgcgcatcgt tcgcccattg | 1140 |
| caggatctg tcaacagcga cgtcacgttg accgtggaca tgggcagctt ccatacttg | 1200 |
| attgcccgt acctgtacac gtccgcgcc cgtcaggtga tgatctcaa cggccagcag | 1260 |
| accatggcg tcgcccgtcc ctgggtatc ggccgctggc tggtaaatcc tgagcgaaa | 1320 |
| gtggtctccg tctccggcga cggcggttc ctgcagtcga gcatggagct ggagaccgcc | 1380 |
| gtccgctga aagccaacgt gctgcatctt atctgggtcg ataacggcta caacatggctc | 1440 |

gctatccagg aagagaaaaa atatcagcgc ctgtccggcg tcgagtttgg gccgatggat 1500
 tttaaagcct atgccgaatc cttcggcgcg aaagggtttg ccgtggaaag cgccgaggcg 1560
 ctggagccga ccttcgcgcgc ggcatggac gtcgacggcc cggcggtagt ggccatcccg 1620
 gtggattatc gcgataacct 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 30
 Pro Gly Ala Lys Ile Asp Lys Val Phe Asp Ser Leu Leu Asp Ser Ser
 35 40 45
 Ile Arg Ile Ile Pro Val Arg His Glu Ala Asn Ala Ala Phe Met Ala
 50 55 60
 Ala Ala Val Gly Arg Ile Thr Gly Lys Ala Gly Val Ala Leu Val Thr

65 70 75 80
 Ser Gly Pro Gly Cys Ser Asn Leu Ile Thr Gly Met Ala Thr Ala Asn
 85 90 95
 Ser Glu Gly Asp Pro Val Val Ala Leu Gly Gly Ala Val Lys Arg Ala
 100 105 110
 Asp Lys Ala Lys Gln Val His Gln Ser Met Asp Thr Val Ala Met Phe
 115 120 125
 Ser Pro Val Thr Lys Tyr Ala Ile Glu Val Thr Ala Pro Asp Ala Leu

130 135 140
 Ala Glu Val Val Ser Asn Ala Phe Arg Ala Ala Glu Gln Gly Arg Pro
 145 150 155 160
 Gly Ser Ala Phe Val Ser Leu Pro Gln Asp Val Val Asp Gly Pro Val
 165 170 175
 Ser Gly Lys Val Leu Pro Ala Ser Gly Ala Pro Gln Met Gly Ala Ala

180 185 190
 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 attcgccgat ggcgcgagct accttcaggg taaaaaagta 120

gtcatcgtcg gctgtggcgc acaggtcttg aaccagggcc tgaacatgcg tgattctggt 180

ctcgatatct cctacgctct gcgtaaagaa gcgattgccg agaagcgcgc gtcctggcgt 240

aaagcgaccg aaaatggttt taaagtgggt acttacgaag aactgatccc acaggcggat 300

ctggtgatta acctgacgcc ggacaagcag cactctgatg tagtgcgcac cgtacagcca 360

ctgatgaaag acggcgcggc gctgggctac tcgcacgggt tcaacatcgt cgaagtgggc 420

gagcagatcc gtaaagatat caccgtagtg atggttgcgc cgaaatgccc aggcaccgaa 480

gtgcgtgaag agtacaaacg tgggttcggc gtaccgacgc tgattgccgt tcaccggaa 540

aacgatccga aaggcgaagg catggcgatt gccaaagcct gggcggctgc aaccggtggt 600

caccgtgcgg gtgtgctgga atcgtccttc gttgcggaag tgaatctga cctgatgggc 660
 gagcaacca tcctgtgcgg tatgttgacg gctggctctc tgctgtgctt cgacaagctg 720
 gtggaagaag gtaccgatcc agcatacgca gaaaaactga ttcagtccgg ttgggaaacc 780
 atcacgaag cactgaaaca gggcggcatc accctgatga tggaccgtct ctctaaccgc 840
 gcgaaactgc gtgcttaigc gctttctgaa cagctgaaag agatcatggc acccctgttc 900
 cagaaacata tggacgacat catctccggc gaattctctt ccggtatgat ggcggactgg 960

gccaacgatg ataagaaact gctgacctgg cgtgaagaga ccggcaaaac cgcgtttgaa 1020
 accgcgccgc agtatgaagg caaaatcggc gagcaggagt acttcgataa aggcgactg 1080
 atgattgcga tggtgaaagc gggcgttgaa ctggcgttcg aaaccatggt cgattccggc 1140
 atcattgaag agtctgcata ttatgaatca ctgcacgagc tgccgctgat tgccaacacc 1200
 atcgcccgtg agcgtctgta cgaaatgaac gtggttatct ctgataccgc tgagtacggt 1260
 aactatctgt tcctttacgc ttgtgtgccg ttgctgaaac cgtttatggc agagctgcaa 1320
 ccgggcgacc tgggtaaagc tattccggaa ggcgcggtag ataacgggca actgcgtgat 1380

gtgaacgaag cgattcgag ccatgcgatt gagcaggtag gtaagaaact gcgcggtat 1440
 atgacagata tgaacgtat tgctgttcg 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 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

385 390 395 400
Ile Ala Arg Lys Arg Leu Tyr Glu Met Asn Val Val Ile Ser Asp Thr

405 410 415
Ala Glu Tyr Gly Asn Tyr Leu Phe Ser Tyr Ala Cys Val Pro Leu Leu

420 425 430
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 accgttcgc caccaccact catggtcgta atatggcggg tgctcgtgcg 60

ctgtggcgcg ccaccggaat gaccgacgcc gatttcggtg agccgattat cgcggttgtg 120

aactcgttca cccaatttgt accgggtcac gtccatctgc gcgatctcgg taaactggtc 180

gccgaacaaa ttgaagcggc tggcggcggt gccaaagagt tcaacaccat tgcggtggat 240

gatgggattg ccatgggcca cgggggggatg ctttattcac tgccatctcg cgaactgac 300

gctgattccg ttgagtatat ggtcaacgcc cactgcgccg acgccatggt ctgcattct 360

aactgcgaca aaatcacccc ggggatgctg atggcttccc tgcgcctgaa tattccggtg 420

atctttgttt ccggcggccc gatggaggcc gggaaaacca aactttccga tcagatcatc 480
 aagctcgatc tggttgatgc gatgatccag ggcgcagacc cgaaagtatc tgactcccag 540
 agcgatcagg ttgaacgttc cgcgtgtccg acctgcggtt cctgctccgg gatgtttacc 600
 gctaactcaa tgaactgcct gaccgaagcg ctgggcctgt cgcagccggg caacggctcg 660
 ctgctggcaa cccacgccga ccgtaagcag ctgttcctta atgctggtaa acgcattgtt 720
 gaattgacca aacgtttatta cgagcaaac gacgaaagtg cactgccgcg taatatcgcc 780

agtaaggcgg cgtttgaana cgccatgacg ctggatatcg cgatgggtgg atcgactaac 840
 accgtacttc acctgctggc ggccggcgag gaagcggaana tcgacttcac catgagtgat 900
 atcgataagc tttcccgcaa ggttcacag ctgtgtaaag ttgcgccgag caccagaaa 960
 taccatatgg aagatgttca ccgtgctggt ggtgttatcg gtattctcgg cgaactggat 1020
 cgcgcggggt tactgaaccg tgatgtgaaa aacgtacttg gcctgacgtt gccgcaaacg 1080
 ctggaacaat acgacgttat gctgacccag gatgacgcgg taaaaaatat gttccgcgca 1140
 ggtcctgcag gcattcgtac cacacaggca ttctcgcaag attgccgttg ggatacgctg 1200

gacgacgac gcgccaatgg ctgtatccgc tcgctggaac acgcctacag caaagacggc 1260
 ggccctggcgg tgctctacgg taactttgcg gaaaacggct gcacgtgaa aacggcaggc 1320
 gtcgatgaca gcacctcaa attcaccggc ccggcgaaag tgtacgaaag ccaggacgat 1380
 gcggtagaag cgattctcgg cggtaaagtt gtcgccggag atgtggtagt aattcgtat 1440
 gaaggccga aaggcggctc ggggatgcag gaaatgctct acccaaccag ctctctgaaa 1500
 tcaatgggtc tcggcaaacg ctgtgcgctg atcaccgacg gtcgtttctc tgggtggcacc 1560
 tctggtcttt ccacggcca cgtctcaccg gaagcggaana gcggcggcag cattggcctg 1620

attgaagatg gtgacctgat cgctatcgac atcccgaacc gtggcattca gttacaggtg 1680
 agcgatgccg aactggcggc gcgtcgtgaa ggcgaggacg ctcgaggtga caaagcctgg 1740
 acgccgaaaa atcgtgaacg tcaggtctcc ttgcccctgc gtgcttatgc cagcctggca 1800
 accagcgccg acaaaggcgc ggtgcgcgat aaatcgaaac tgggggggtta a 1851

<210> 6

<211> 616

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 6

Met Pro Lys Tyr Arg Ser Ala Thr Thr Thr His Gly Arg Asn Met Ala

1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Met Thr Asp Ala Asp Phe
 20 25 30
 Gly Lys Pro Ile Ile Ala Val Val Asn Ser Phe Thr Gln Phe Val Pro
 35 40 45
 Gly His Val His Leu Arg Asp Leu Gly Lys Leu Val Ala Glu Gln Ile
 50 55 60
 Glu Ala Ala Gly Gly Val Ala Lys Glu Phe Asn Thr Ile Ala Val Asp
 65 70 75 80

 Asp Gly Ile Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser
 85 90 95
 Arg Glu Leu Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Cys
 100 105 110
 Ala Asp Ala Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly
 115 120 125
 Met Leu Met Ala Ser Leu Arg Leu Asn Ile Pro Val Ile Phe Val Ser
 130 135 140

 Gly Gly Pro Met Glu Ala Gly Lys Thr Lys Leu Ser Asp Gln Ile Ile
 145 150 155 160
 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 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 cgctgcacg aactggggat tgaagaaatt 60
ttcgggtgtgc caggcgatta taacctgcag ttcttgacc agattatctc gcacaaagat 120
atgaagtggg tcggtaacgc caacgaactg aacgcgagct atatggcaga tggttatgcc 180
cgtacaaaaa aagctgctgc gtttctgacg acctttggcg ttggcgaact gagcgccgtc 240

aacggactgg caggaagcta cgccgagaac ctgccagtgt tcgaaattgt tgggtgcct 300
acttctaagg ttcagaatga aggcaaattt gtgcaccata ctctggctga tggggatatt 360
aaacatttta tgaaaatgca tgaaccggtt actgcggccc gcacgtgct gacagcagag 420
aatgctacgg ttgagatcga ccgcgtctg tctgcgtgc tgaaagagcg caagccggtg 480
tatatcaatc tgctgtcga tggtgccgca gcgaaagccg aaaagccgtc gctgccactg 540
aaaaaagaaa acagcacctc caatacatcg gaccaggaaa ttctgaataa aatccaggaa 600
tactgaaga atgcgaagaa accgatcgtc atcaccggac atgagatcat ctcttttggc 660

ctggaaaaaa cggtcacgca gttcatttct aagaccaaac tgcctatcac caccctgaac 720

ttcggcaaat ctagcgtcga tgaagcgctg ccgagttttc tgggtatcta taatggtacc 780
ctgtccgaac cgaacctgaa agaattcgtc gaaagcgagg actttatcct gatgctgggc 840
gtgaaactga cggatagctc cacaggcgca tttaaccacc atctgaacga gaataaaatg 900
atttccttga atatcgacga aggcaaaatc tttaacgagc gcatccagaa cttcgatttt 960
gaatctctga ttagttcgtc gctggatctg tccgaaattg agtataaagg taaatatatt 1020
gataaaaaac aggaggattt tgtgccgtct aatgcgctgc tgagtcagga tcgtctgtgg 1080

caagccgtag aaaacctgac acagtctaata gaaacgattg ttgcggaaca gggaacttca 1140
tttttcggcg cctcatccat ttttctgaaa tccaaaagcc atttcattgg ccaaccgctg 1200
tgggggagta ttggttatac ctttccggcg gcgctgggtt cacagattgc agataaggaa 1260
tcacgccatc tgctgtttat tgggtacggc agcctgcagc tgactgtcca ggaactgggg 1320
ctggcgatcc gtgaaaaaat caatccgatt tgctttatca tcaataacga cggtacacc 1380
gtcgaacgag aaattcatgg accgaatcaa agttacaatg acatccgat gtggaactat 1440
agcaaaactgc cggaatcctt tggcgcgaca gaggatcgcg tggtagtaa aattgtgcgt 1500

acggaaaacg aatttgtgtc gggtatgaaa gaagcgagg ctgaccgaa tcgcatgtat 1560
tggattgaac tgatcctggc aaaagaaggc gcaccgaaag ttctgaaaaa gatggggaaa 1620
ctgtttgcgg agcaaaaataa 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 xyloxidans

<400> 9

atgaaagctc tggtttatca cggtgaccac aagatctcgc ttgaagacaa gccaagccc 60
acccttcaaa agcccacgga tgtagtagta cgggttttga agaccacgat ctgcggcacg 120
gatctcggca tctacaaagg caagaatcca gaggtcgccg acgggcgcat cctgggccat 180
gaaggggtag gcgtcatcga ggaagtgggc gagagtgtca cgcagttcaa gaaaggcgac 240
aaggtcctga tticctgcgt cacttcttgc ggctcgtgcg actactgcaa gaagcagctt 300
tactccatt gccgcgacgg cgggtggatc ctgggttaca tgatcgatgg cgtgcaggcc 360

gaatacgtcc gcacccgca tgccgacaac agcctctaca agatcccca gacaattgac 420
gacgaaatcg ccgtcctgct gagegacatc ctgccaccg gccacgaaat cggcgtccag 480
tatgggaatg tccagccggg cgatcggtg gctattgtcg gcgcgggccc cgtcggcatg 540
tccgtactgt tgaccgcca gttctactcc cctcgacca tcatcgtgat cgacatggac 600
gagaatcgcc tccagctcgc caaggagctc ggggcaacgc acaccatcaa ctccggcacg 660
gagaacgttg tcgaagccgt gcataggatt gcggcagagg gattcgatgt tgcgatcgag 720
gcggtgggca taccggcgac ttgggacatc tgccaggaga tcgtcaagcc cggcgcgcac 780

atcgccaacg tcggcgtgca tggcgtcaag gttgacttcg agattcagaa gctctggatc 840
aagaacctga cgatcaccac gggactggtg aacacgaaca cgacgcccac gctgatgaag 900
gtcgcctcga ccgacaagct tccgttgaag aagatgatta cccatcgctt cgagctggcc 960
gagatcgagc acgcctatca ggtattcttc aatggcgcca aggagaaggc gatgaagatc 1020
atcctctcga acgcaggegc tgcctga 1047

<210> 10

<211> 348

<212> PRT

<213> Achromobacter xyloxidans

<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 | Val | Arg |
| Val | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Leu | Lys | Thr | Thr |
| Ile | Cys | Gly | Thr |
| Asp | Leu | Gly | Ile |
| Tyr | Lys | Gly | Lys |
| | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Asn | Pro | Glu | Val |
| Ala | Asp | Gly | Arg |
| Ile | Leu | Gly | His |
| Glu | Gly | Val | Gly |

50 55 60
 Val Ile Glu Glu Val Gly Glu Ser Val Thr Gln Phe Lys Lys Gly Asp

 65 70 75 80
 Lys Val Leu Ile Ser Cys Val Thr Ser Cys Gly Ser Cys Asp Tyr Cys
 85 90 95
 Lys Lys Gln Leu Tyr Ser His Cys Arg Asp Gly Gly Trp Ile Leu Gly
 100 105 110
 Tyr Met Ile Asp Gly Val Gln Ala Glu Tyr Val Arg Ile Pro His Ala
 115 120 125
 Asp Asn Ser Leu Tyr Lys Ile Pro Gln Thr Ile Asp Asp Glu Ile Ala

 130 135 140
 Val Leu Leu Ser Asp Ile Leu Pro Thr Gly His Glu Ile Gly Val Gln
 145 150 155 160
 Tyr Gly Asn Val Gln Pro Gly Asp Ala Val Ala Ile Val Gly Ala Gly
 165 170 175
 Pro Val Gly Met Ser Val Leu Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Ser Pro Ser
 180 185 190
 Thr Ile Ile Val Ile Asp Met Asp Glu Asn Arg Leu Gln Leu Ala Lys

 195 200 205
 Glu Leu Gly Ala Thr His Thr Ile Asn Ser Gly Thr Glu Asn Val Val
 210 215 220
 Glu Ala Val His Arg Ile Ala Ala Glu Gly Val Asp Val Ala Ile Glu
 225 230 235 240
 Ala Val Gly Ile Pro Ala Thr Trp Asp Ile Cys Gln Glu Ile Val Lys
 245 250 255
 Pro Gly Ala His Ile Ala Asn Val Gly Val His Gly Val Lys Val Asp

 260 265 270
 Phe Glu Ile Gln Lys Leu Trp Ile Lys Asn Leu Thr Ile Thr Thr Gly
 275 280 285
 Leu Val Asn Thr Asn Thr Thr Pro Met Leu Met Lys Val Ala Ser Thr
 290 295 300

Asp Lys Leu Pro Leu Lys Lys Met Ile Thr His Arg Phe Glu Leu Ala
 305 310 315 320
 Glu Ile Glu His Ala Tyr Gln Val Phe Leu Asn Gly Ala Lys Glu Lys

325 330 335
 Ala Met Lys Ile Ile Leu Ser Asn Ala Gly Ala Ala
 340 345

<210> 11

<211> 1713

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 11

| | |
|--|------|
| ttgacaaaag caacaaaaga acaaaaatcc cttgtgaaaa acagaggggc ggagcttggt | 60 |
| gttgattgct tagtggagca aggtgtcaca catgtatttg gcattccagg tgcaaaaatt | 120 |
| gatgcggtat ttgacgcttt acaagataaa ggacctgaaa ttatcgttgc ccggcacgaa | 180 |
| caaaacgcag cattcatggc ccaagcagtc ggccgtttaa ctggaaaacc gggagtcgtg | 240 |
| | |
| ttagtcacat caggaccggg tgcctctaac ttggcaacag gcctgctgac agcgaacact | 300 |
| gaaggagacc ctgtcgttgc gcttgctgga aacgtgatcc gtgcagatcg tttaaacgg | 360 |
| acacatcaat ctttggataa tgcggcgcta ttccagccga ttacaaaata cagtgtagaa | 420 |
| gttcaagatg taaaaaatat accggaagct gttacaaatg catttaggat agcgtcagca | 480 |
| gggcaggctg gggccgcttt tgtgagcttt ccgcaagatg ttgtgaatga agtcacaaat | 540 |
| acgaaaaacg tgcgtgctgt tgcagcgcca aaactcggtc ctgcagcaga tgatgcaatc | 600 |
| agtgcggcca tagcaaaaat ccaaacagca aaacttcctg tcgttttgggt cggcatgaaa | 660 |
| | |
| ggcgggaagac cggaagcaat taaagcggtt cgcaagcttt tgaaaaaggt tcagcttcca | 720 |
| tttgttgaaa catatcaagc tgccggtacc ctttctagag atttagagga tcaatatattt | 780 |
| ggccglatcg gtttgttccg caaccagcct ggcgatttac tgctagagca ggcagatggt | 840 |
| gttctgacga tcggctatga cccgattgaa tatgatccga aattctggaa tatcaatgga | 900 |
| gaccggacaa ttatccattt agacagagatt atcgtgaca ttgatcatgc ttaccagcct | 960 |
| gatcttgaat tgatcggatg cattccgtcc acgatcaatc atatcgaaca cgatgctgtg | 1020 |
| aaagtggaat ttgcagagcg tgagcagaaa atcctttctg atttaaaaca atatatgcat | 1080 |
| | |
| gaaggtgagc aggtgcctgc agattggaat tcagacagag cgcaccctct tgaaatcggt | 1140 |
| aaagagttgc gtaatgcagt cgatgatcat gttacagtaa cttgcgatat cggttcgcac | 1200 |

gccatttggg tgcacgtta tttccgcagc tacgagccgt taacattaat gatcagtaac 1260
 ggtatgcaaa cactcggcgt tgcgcttcct tgggcaatcg gcgcttcatt ggtgaaaccg 1320
 ggagaaaaag tggtttctgt ctctgggtgac ggcggtttct tattctcagc aatggaatta 1380
 gagacagcag ttcgactaaa agcaccaatt gtacacattg tatggaacga cagcacatat 1440
 gacatggttg cattccagca attgaaaaaa tataaccgta catctgcggt cgatttcgga 1500

aatatcgata tcgtgaaata tgcggaaagc ttcggagcaa ctggcttgcg ctagaatca 1560
 ccagaccagc tggcagatgt tctgcgtcaa ggcatgaacg ctgaaggtcc tgtcatcatc 1620
 gatgtcccgg ttgactacag tgataacatt aatttagcaa gtgacaagct tccgaaagaa 1680
 ttcggggaac tcatgaaaac gaaagctctc 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
 145 150 155 160
 Gly Gln Ala Gly Ala Ala Phe Val Ser Phe Pro Gln Asp Val Val Asn
 165 170 175
 Glu Val Thr Asn Thr Lys Asn Val Arg Ala Val Ala Ala Pro Lys Leu
 180 185 190
 Gly Pro Ala Ala Asp Asp Ala Ile Ser Ala Ala Ile Ala Lys Ile Gln
 195 200 205

 Thr Ala Lys Leu Pro Val Val Leu Val Gly Met Lys Gly Gly Arg Pro
 210 215 220
 Glu Ala Ile Lys Ala Val Arg Lys Leu Leu Lys Lys Val Gln Leu Pro
 225 230 235 240
 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
 305 310 315 320
 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 cagattgac tgcaactccc gtgtcatcac tgctaagaga 60

acctttgctt tggccaccgc tgctgctgct tacagcagac cagctgcccg tticgttaag 120

ccaatgatca ctacccgtgg ttggaagcaa atcaacttcg gtggtactgt tgaaaccgtc 180
 tacgaaagag ctgactggcc aagagaaaag ttgttgact acttcaagaa cgacactttt 240
 gctttgatcg gttacggttc ccaaggttac ggtcaagggt tgaacttgag agacaacggt 300
 ttgaacgtta tcattgggtg ccgtaaagat ggtgcttctt ggaaggctgc catcgaagac 360
 ggttgggttc caggcaagaa cttgttact gttgaagatg ctatcaagag aggtagtac 420
 gttatgaact tgttgtccga tgccgctcaa tcagaaacct ggctgctat caagccattg 480
 ttgaccaagg gtaagacttt gtacttctcc cacggtttct cccagttctt caaggacttg 540

actcacgttg aaccaccaa ggacttagat gttatcttgg ttgctccaaa gggttccggt 600
 agaactgtca gatctttgtt caaggaaggt cgtggtatta actcttctta cgccgtctgg 660
 aacgatgtca ccgtaaggc tcacgaaaag gcccaagctt tggccgttgc cattggttcc 720
 ggttacgttt accaaaccac ttctgaaaga gaagtcaact ctgacttgta cggtgaaaga 780
 ggttggttaa tgggtggtat ccacggtatg ttcttggtc aatacgacgt cttgagagaa 840
 aacggtcact ccccatctga agctttcaac gaaaccgtcg aagaagctac ccaatctcta 900
 taccattga tcgtaagta cggtatggat tacatgtacg atgcttggtc caccaccgcc 960

agaagagggtg ctttgactg gtaccaatc ttcaagaatg ctttgaagcc tgttttccaa 1020
 gacttgtagc aatctacaa gaacgtacc gaaaccaaga gatctttgga attcaactct 1080
 caacctgact acagagaaaa gctagaaaag gaattagaca ccatcagaaa catggaaatc 1140
 tggaagggtg gtaaggaagt cagaaagttg agaccagaaa accaataa 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 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

atgaaggtgt ttacgataa agactgcgat ctgagcatca tccagggaaa gaaggttgct 60
attataggat atggttccca aggacacgca caagccttga acttgaaaga ttctggggtc 120
gacgtgacag taggtctgta taaaggtgct gctgatgcag caaaggctga agcacatggc 180
tttaaagtca cagatgttgc agcggctggt gctggcgctg atttagtcat gattttaatt 240
ccagatgaat ttcaatcgca attgtacaaa aatgaaatag aaccaaacat taagaagggc 300
gctaccttgg ctttcagtc tggatttgcc attcattaca atcaagtagt ccccagggca 360

gatttggacg ttattatgat tgcacctaag gctccggggc atactgttag gagcgaattt 420
gttaaggggtg gtgttatcc agatttgatc gctatatacc aagacgttag cggaaacgct 480
aagaatgtag ctttaagcta cgcagcagga gttggtggcg ggagaacggg tataatagaa 540
accactttta aagacgagac tgagacagat ttatttggag aacaagcggg tctgtgcgga 600
ggaactgttg aattggttaa agcaggcttt gagacgcttg tcgaagcagg gtacgtcccc 660
gaaatggcat acttcaatg tctacatgaa ttgaagtga tagtagactt aatgtatgaa 720
ggtggtatag ctaatatgaa ctattccatt tcaaataatg cagaatatgg tgagtatgtc 780

accggacctg aagtcattaa cgcagaatca agacaagcca tgagaaatgc cttgaaacgt 840
atccaggacg gtgaatacgc taagatgttc ataagtgaag gcgctacggg ttacccgagt 900

atgactgcta aaagaagaaa caatgcagca catggatcgc aaattattgg tgaacagtta 960
 aggtctatga tgccttgat cggctgcta 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 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 |
| gttaaatac ctaatcgtgc tatgttgcgt gcaactggta tgcaagatga agactttgaa | 120 |
| aaacctatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta | 180 |
| catgactttg gtaaactagc caaagtcggt gttaaggaag ctggtgcttg gccagttcag | 240 |
| ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa cccaaggaat gcgtttctcc | 300 |
| ttgacatctc gtgatattat tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg | 360 |

gatgcttttg tagccattgg cggtttgat aaaaacatgc ccggttctgt tatcgctatg 420
 gctaacaatgg atatccagc catttttgct tacggcggaa caattgcacc tggtaattta 480
 gacggcaaag ataatgatgt agtctctgtc ttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc 540
 gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaagttaatg cttgtcccgg tcctggaggc 600
 tgcggtggta tgtatactgc taacacaatg gcgacagcta ttgaagtttt gggacttagc 660
 ctcccggtt catcttctca cccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa 720
 gctggctcgc ctgttgtaa aatgctcga atgggcttaa aaccttctga cattttaacg 780

cgtgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggagggtc aaccaactca 840
 acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtg aattgacact tgatgatttc 900
 aatactttcc aagaaaaagt tcttcatttg gctgatttga aaccttctgg tcaatatgta 960
 ttccaagacc ttacaaggt cggaggggta ccagcagtta tgaatatct ccttaaaaat 1020
 ggcttccttc atggtgaccg tatcacttgt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag 1080
 gcttttgatg atttaacacc tggtaaaaag gttattatgc cgcttgaaaa tcctaaacgt 1140
 gaagatggtc cgctcattat tctccatggt aacttggtc cagacggtgc cgttgccaaa 1200

gtttctgggtg taaaagtgcg tcgtcatgtc ggtcctgcta aggtctttaa ttctgaagaa 1260
 gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg gtgatgttgt tgcgtacgt 1320
 tttgtaggac caaaggcgg tcctggatg cctgaaatgc tttcccttc atcaatgatt 1380
 gttggtaaag ggcaaggta aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctgaggtggt 1440
 acttatggtc ttgtcgtggg tcatatcgt cctgaagcac aagatggcgg tccaatcgcc 1500
 tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca ctaaggaatt acactttgat 1560
 atctccgatg aagagttaaa acatcgtcaa gagaccattg aattgccacc gctctattca 1620

cgcggtatcc ttggtaaata tgctcacatc gtttcgtctg cttctagggg agccgtaaca 1680
 gacttttgga 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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Gln Asp Glu Asp Phe Glu Lys Pro Ile Val Gly Val Ile Ser

35

40

45

Thr Trp Ala Glu Asn Thr Pro Cys Asn Ile His Leu His Asp Phe Gly

50

55

60

Lys Leu Ala Lys Val Gly Val Lys Glu Ala Gly Ala Trp Pro Val Gln

65

70

75

80

Phe Gly Thr Ile Thr Val Ser Asp Gly Ile Ala Met Gly Thr Gln Gly

85

90

95

Met Arg Phe Ser Leu Thr Ser Arg Asp Ile Ile Ala Asp Ser Ile Glu

100

105

110

Ala Ala Met Gly Gly His Asn Ala Asp Ala Phe Val Ala Ile Gly Gly

115

120

125

Cys Asp Lys Asn Met Pro Gly Ser Val Ile Ala Met Ala Asn Met Asp

130

135

140

Ile Pro Ala Ile Phe Ala Tyr Gly Gly Thr Ile Ala Pro Gly Asn Leu

145

150

155

160

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

165

170

175

Trp Asn His Gly Asp Met Thr Lys Glu Glu Val Lys Ala Leu Glu Cys

180

185

190

Asn Ala Cys Pro Gly Pro Gly Gly Cys Gly Gly Met Tyr Thr Ala Asn

195

200

205

Thr Met Ala Thr Ala Ile Glu Val Leu Gly Leu Ser Leu Pro Gly Ser

210

215

220

Ser Ser His Pro Ala Glu Ser Ala Glu Lys Lys Ala Asp Ile Glu Glu

225

230

235

240

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

245

250

255

Asp Ile Leu Thr Arg Glu Ala Phe Glu Asp Ala Ile Thr Val Thr Met

260

265

270

Ala Leu Gly Gly Ser Thr Asn Ser Thr Leu His Leu Leu Ala Ile Ala

275 280 285
 His Ala Ala Asn Val Glu Leu Thr Leu Asp Asp Phe Asn Thr Phe Gln

 290 295 300
 Glu Lys Val Pro His Leu Ala Asp Leu Lys Pro Ser Gly Gln Tyr Val
 305 310 315 320
 Phe Gln Asp Leu Tyr Lys Val Gly Gly Val Pro Ala Val Met Lys Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Lys Asn Gly Phe Leu His Gly Asp Arg Ile Thr Cys Thr Gly
 340 345 350
 Lys Thr Val Ala Glu Asn Leu Lys Ala Phe Asp Asp Leu Thr Pro Gly

 355 360 365
 Gln Lys Val Ile Met Pro Leu Glu Asn Pro Lys Arg Glu Asp Gly Pro
 370 375 380
 Leu Ile Ile Leu His Gly Asn Leu Ala Pro Asp Gly Ala Val Ala Lys
 385 390 395 400
 Val Ser Gly Val Lys Val Arg Arg His Val Gly Pro Ala Lys Val Phe
 405 410 415
 Asn Ser Glu Glu Glu Ala Ile Glu Ala Val Leu Asn Asp Asp Ile Val

 420 425 430
 Asp Gly Asp Val Val Val Val Arg Phe Val Gly Pro Lys Gly Gly Pro
 435 440 445
 Gly Met Pro Glu Met Leu Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Gly Lys Gly
 450 455 460
 Gln Gly Glu Lys Val Ala Leu Leu Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Thr Tyr Gly Leu Val Val Gly His Ile Ala Pro Glu Ala Gln Asp Gly

 485 490 495
 Gly Pro Ile Ala Tyr Leu Gln Thr Gly Asp Ile Val Thr Ile Asp Gln
 500 505 510
 Asp Thr Lys Glu Leu His Phe Asp Ile Ser Asp Glu Glu Leu Lys His
 515 520 525

Arg Gln Glu Thr Ile Glu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Arg Gly Ile Leu
 530 535 540
 Gly Lys Tyr Ala His Ile Val Ser Ser Ala Ser Arg Gly Ala Val Thr

545 550 555 560
 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 in *S. cerevisiae*

<400> 19

atgtatacag taggtgacta tctgttggac agattacacg aattaggtat agaagaaata 60
 ttcggagtac caggtgacta caatttgcaa tttctagatc aaattatttc acacaaagat 120
 atgaaatggg tgggaaatgc taatgagtta aatgcctcct atatggccga cgggtacgca 180

agaacgaaaa aggctgcggc attcttgact acatttgggtg ttggcgaatt atccgcagtt 240
 aatggcttag cgggctccta tgctgagaac ctgcctgttg ttgagatcgt gggatctcct 300
 acctcgaag tgcagaacga aggttaagttt gttcaccata cgttggctga tgggtgatttc 360
 aagcacttta tgaagatgca cgaaccggtt actgctgcca ggactttatt gacagccgag 420
 aatgcaactg ttgaaattga tagagtgttg tctgccttac taaaggaaag aaagccggtt 480
 tacatcaatt tacctgtaga tgtagctgcc gctaaggctg aaaaaccatc ctgacctctt 540
 aagaaggaaa attccacgtc gaatacatct gatcaagaga ttctgaacaa aatacaggaa 600

agtctgaaga atgccaagaa accaattgta atcacaggcc atgaaattat atcggttcggc 660
 ctagagaaga ctgttactca gtttatttca aagactaagt tacctattac tactttgaac 720
 tttggtaaat catctgttga tgaagcattg ccctcatttt tggggattta caacgttact 780
 ctgtcagagc caaacttgaa ggaatttgtg gaatctgctg attttattct tatgttgggt 840
 gtaaagctta ccgattctag tacgggtgca ttactcacc atcttaatga aaataaaatg 900
 atttccttga atatcgatga aggtaaaatt ttcaacgaaa gaatccaaaa tttcgacttc 960
 gaatccctga tatcatctct tcttgacttg tccgaaattg aatataaagg caagtacata 1020

gataaaaagc aagaagattt tgtaccttct aacgcgctgt tgtcacaaga tagactgtgg 1080

caagctgtcg aaaatttgac ccaaagtaat gagacgatcg tggctgaaca aggcacttct 1140
 ttcttcggtg cctcatctat atttctgaaa tcgaaatcac attttattgg tcaacccttg 1200
 tggggatcta taggatacac tttccccgca gctctaggca gccaaattgc agataaagaa 1260
 tctagacatt tattgtttat cggagatgga tcattgcaac tgactgtcca agaattagga 1320
 ctagccatta gagagaagat aaacccaatc tgctttatca ttaataacga tggttacacg 1380
 gttgagaggg aaattcatgg tccgaaccag agttataatg acattcctat gtggaattac 1440

tcaaaactgc cagaaagttt cggggcaacg gaagacagag ttgtgtccaa aattgtgaga 1500
 acagaaaatg aattcgtatc cgtgatgaaa gaagctcaag cagatccaaa taggatgtat 1560
 tggatagaac ttattctagc aaaggagggt gcacctaag ttttgaaaaa gatgggtaag 1620
 ttatttgcag aacaaaacaa gage 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 | 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> 21

<211> 2145

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> constructed chimeric gene

<400> 21

gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg 60

gagaatcttc taacgataaa cccctgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct 120

acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aagggacgtg 180

| | |
|--|------|
| caatgcagac gacagatcta aatgaccgtg tcggtgaagt gttcgccaaa cttttcggtt | 240 |
| aacacatgca gtgatgcacg cgcgatggtg ctaagttaca tataatatata tatatatata | 300 |
| tatagccata gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact | 360 |
| agcgcgcgca cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa | 420 |
| tgggattcca ctttccgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga | 480 |
| ataaaaagag agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat | 540 |
| gaacaatggt aacgagttgt ggctgttgcc agggagggtg gttctcaact tttaatgtat | 600 |
| ggccaaatcg ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt | 660 |
| cctccttctt gtcctttctt aattctgttg taattacctt cctttgtaat ttttttgta | 720 |
| attattcttc ttaataatcc aaacaaacac acatattaca atagctagct gaggatgaag | 780 |
| gcattagttt atcatgggga tcacaaaatt tcgttagaag acaaaccaaa acccactctg | 840 |
| cagaaaccaa cagacgttgt ggtaggggtg ttgaaaacaa caatttgagg tactgacttg | 900 |
| ggaatatata aaggtaagaa tcctgaagtg gcagatggca gaatcctggg tcatgagggc | 960 |
| gttggcgtca ttgaagaagt gggcgaatcc gtgacacaat tcaaaaaggg ggataaagtt | 1020 |
| ttaatctcct gcgttactag ctgtggatcg tgtgattatt gcaagaagca actgtattca | 1080 |
| cactgtagag acggtggctg gattttaggt tacatgatcg acggtgtcca agccgaatac | 1140 |
| gtcagaatac cacatgtcga caattcattg tataagatcc cgcaaactat cgatgatgaa | 1200 |
| attgcagtac tactgtccga tattttacct actggacatg aaattggtgt tcaatatggt | 1260 |
| aacgttcaac caggcgatgc ttagcaatt gtaggagcag gtctgttgg aatgtcagtt | 1320 |
| ttgttaactg ctcaatttta ctgcctagt accattattg ttatcgacat ggacgaaaac | 1380 |
| cgtttacaat tagcgaagga gcttggggcc acacacacta ttaactcgg tactgaaat | 1440 |
| gttgtcgaag ctgtgcatcg tatagcagcc gaaggagtgg atgtagcaat agaagctgtt | 1500 |
| ggtataccg caacctggga catctgtcag gaaattgtaa aaccggcgc tcataatgcc | 1560 |
| aacgtgggag ttcatggtgt taaggtaggac ttgaaattc aaaagttgtg gattaagaat | 1620 |
| ctaaccatca ccaactggtt ggtaaacact aatactacce caatgttgat gaaggtagcc | 1680 |
| tctactgata aattgccttt aaagaaaatg attactcaca ggtagtgatt agctgaaatc | 1740 |
| gaacacgcat atcaggtttt cttgaatggc gctaaagaaa aagctatgaa gattattcta | 1800 |
| tctaattgag gtgccgccta attaatgaag agtaagcgaa tttcttatga tttatgattt | 1860 |
| ttattattaa ataagttata aaaaaataa gtgtatacaa attttaaagt gactcttagg | 1920 |
| ttttaaaacg aaaattctta ttcttgagta actctttcct gtaggtcagg ttgctttctc | 1980 |
| aggtatagca tgaggctcgt cttattgacc acacctctac cggcatgccg agcaaatgcc | 2040 |

| | |
|---|------|
| tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatatgcta actccagcaa tgagttgatg | 2100 |
| aatctcgggtg tgtatatttat gtcctcagag gacaacacct gtggt | 2145 |
| <210> 22 | |
| <211> 4280 | |
| <212> DNA | |
| <213> artificial sequence | |
| <220><223> vector | |
| <400> 22 | |
| ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg gtcatactg | 60 |
| tttctgtgt gaaattgta tccgtcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata | 120 |
| aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagt agctaactca cattaattgc gttgcgtca | 180 |
| ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc | 240 |
| gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg | 300 |
| cgctcggtcg ttcggctcgc gcgagcggta tcagtcact caaaggcggg aatacgtta | 360 |
| tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gaaaaggcc | 420 |
| aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttcata ggctccgcc ccctgacgag | 480 |
| catcacaaaa atcgacgtc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac | 540 |
| caggcgtttc cccctggaag ctccctctg cgctctctg ttcggacct gccgcttacc | 600 |
| ggatacctgt ccgctttct ccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt | 660 |
| aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc | 720 |
| gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccggtaga | 780 |
| cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta | 840 |
| ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta | 900 |
| tttggtatct gcgctctgt gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga | 960 |
| tccggcaaac aaaccacgc tggtagcggg ggttttttg tttgcaagca gcagattacg | 1020 |
| cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc tgacgtcag | 1080 |
| tggaaacgaaa actcacgta agggattttg gtcatagat tatcaaaaag gatcttcacc | 1140 |
| tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact | 1200 |
| tggctcgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct | 1260 |
| cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta | 1320 |
| ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta | 1380 |

| | |
|---|------|
| tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc | 1440 |
| gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat | 1500 |
| agtttgcga acgttgttgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt | 1560 |
| atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg | 1620 |
| tgcaaaaaag cggtagctc ctccggctc cgcagcttg tcagaagtaa gttggccgca | 1680 |
| gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta | 1740 |
| | |
| agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg | 1800 |
| cgaccgagtt gctcttgccc ggctcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact | 1860 |
| ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg | 1920 |
| ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt | 1980 |
| actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga | 2040 |
| ataaggcgca cacggaatg ttgaatactc atactcttc ttttcaata ttattgaagc | 2100 |
| atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatgtg aatgtattta gaaaaataaa | 2160 |
| | |
| caaatagggg ttccgcgac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt | 2220 |
| attatcatga cattaacct aaaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgct | 2280 |
| ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt | 2340 |
| ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg | 2400 |
| tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcacatatg | 2460 |
| cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca | 2520 |
| ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgga tcgggtcggg cctcttcgct attacgccag | 2580 |
| | |
| ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagtggg taacgccagg gttttccag | 2640 |
| tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtga ttcgagctcg gtacccccgg ctctgagaca | 2700 |
| glagtaggtt agtcatcgt ctaccgacgc gcaggaaaag aaagaagcat tgcggttac | 2760 |
| gtattctaatt gttcagcccg cggaacgcca gcaaatcacc accatgcgc atgatactga | 2820 |
| gtcttgata cgttgggtt ccagtgtact gagagtgcac cataccacag cttttcaatt | 2880 |
| caattcatca tttttttttt attctttttt ttgatttcgg tttctttgaa attttttga | 2940 |
| ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacg aaggaaggag cacagactta gatttgtata | 3000 |
| | |
| tatagcata tgiagtgttg aagaacatg aaattgccca gtattcttaa cccaactgca | 3060 |
| cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg | 3120 |
| tgctgtact catcctagtc ctgttgctgc caagctatit aatatcatgc acgaaaagca | 3180 |
| aacaaacttg tgtgcttcat tggatgttcg taccaccaag gaattactgg agttagtga | 3240 |

| | |
|--|------|
| agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa aacacatgtg gatatcttga ctgatttttc | 3300 |
| catggagggc acagttaagc cgctaaaggc attatccgcc aagtacaatt ttttactctt | 3360 |
| cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt | 3420 |
| | |
| atacagaata gcagaatggg cagacattac gaatgcacac ggtgtggtgg gccaggtat | 3480 |
| tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga agtaacaaag gaacctagag gccttttgat | 3540 |
| gttagcagaa ttgtcatgca agggctccct atctactgga gaatatacta aggggtactgt | 3600 |
| tgacattgcg aagagcgaca aagattttgt tatcggcttt attgctcaaa gagacatggg | 3660 |
| tggaagagat gaaggttacg attggttgat tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa | 3720 |
| gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac cgtggatgat gtggctctta caggatctga | 3780 |
| cattattatt gtggaagag gactatttgc aaagggaagg gatgctaagg tagagggtga | 3840 |
| | |
| acgttacaga aaagcaggct gggaagcata ttgagaaga tgcggccagc aaaactaaaa | 3900 |
| aactgtatta taagtaaag catgtatact aaactcaca attagagctt caatttaatt | 3960 |
| atatcagtta ttacctatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc | 4020 |
| gcatcaggaa attgtaaagc ttaatatatt gttaaaatc gcgttaaatt ttgtttaat | 4080 |
| cagctcattt ttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc ttcagcccg cgaacgccag | 4140 |
| caaatcacca cccatgcga tgatactgag tctgttacac gctgggcttc cagtgatgat | 4200 |
| acaacgagtt agccaagggtg agcacggatg tctaaattag aattacgttt taatatcttt | 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 atacgtaatc cgcaatgcac tagtaccaca ggtgtgtgcc tctg | 54 |

<210> 25

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 25

cagaggacaa cacctgtggt actagtgcac tgcggattac gtattctaata gttc 54

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 26

caccttggt aactcgttgt atcatcac 28

<210> 27

<211> 100

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 27

ttttaagccg aatgagtgc agaaaaagcc cacaacttat caagtgcata tgaacaaagg 60

gcgaaacttc gcatgcttgc atttagtcgt gcaatgtatg 100

<210> 28

<211> 98

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 28

cccaattggt aaatattcaa caagagacgc gcagtacgta acatgcgaat tgcgtaattc 60

acggcgataa caccttggt aactcgttgt atcatcac 98

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 29

tcggtttttg caatatgacc 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 cgtgcatcac tgcattg 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 agaaatcgta gttctgttta cgattcaatg 60

gttaaatcac ctaatcgtgc tatgttgcgt gcaactggta tgcaagatga agactttgaa 120

| | |
|--|------|
| aaacatatcg tcggtgtcat ttcaacttgg gctgaaaaca caccttgtaa tatccactta | 180 |
| catgactttg gtaaactagc caaagtcggt gttaaggaag ctggtgcttg gccagttcag | 240 |
| ttcggaacaa tcacggtttc tgatggaatc gccatgggaa cccaaggaat gcgtttctcc | 300 |
| ttgacatctc gtgatatatt tgcagattct attgaagcag ccatgggagg tcataatgcg | 360 |
| | |
| gatgcttttg tagccattgg cggtttgat aaaaacatgc ccggttctgt tatcgctatg | 420 |
| gctaacatgg atatcccagc catttttgc taccggcgaa caattgcacc tggtaattta | 480 |
| gacggcaaag atactgattt agtctctgtc ttgaagggtg tcggccattg gaaccacggc | 540 |
| gatatgacca aagaagaagt taaagctttg gaatgtaatg cttgtcccgg tcctggaggc | 600 |
| tgcggtggtg tgtatactgc taacacaatg gcgacagcta ttgaagtttt gggacttagc | 660 |
| cttccgggtt catcttctca cccggctgaa tccgcagaaa agaaagcaga tattgaagaa | 720 |
| gctggtcgcg ctgttgtcaa aatgctcgaa atgggcttaa aaccttctga cattttaacg | 780 |
| | |
| cgatgaagctt ttgaagatgc tattactgta actatggctc tgggagggtc aaccaactca | 840 |
| acccttcacc tcttagctat tgcccatgct gctaattgtg aattgacact tgatgatttc | 900 |
| aatactttcc aagaaaaagt tcctcatttg gctgatttga aaccttctgg tcaatatgta | 960 |
| ttccaagacc ttacaaggc cggaggggta ccagcagtta tgaaatatct ccttaaaaat | 1020 |
| ggcttccttc atggtgaccg taccacttgt actggcaaaa cagtcgctga aaatttgaag | 1080 |
| gcttttgatg atttaacacc tgggtcaaaag gttattatgc cgcttgaaaa tcctaaccgt | 1140 |
| gaagatggtc cgctcattat tctccatggt aacttggctc cagacgggtc cgttgccaaa | 1200 |
| | |
| gtttctgggt taaaagtgcg tcgtcatgtc ggtcctgcta aggtctttta ttctgaagaa | 1260 |
| gaagccattg aagctgtctt gaatgatgat attgttgatg gtgatgttgt tgtcgtacgt | 1320 |
| ttttaggtac caaaggcggt tcctgggtatg cctgaaatgc tttcccttcc atcaatgatt | 1380 |
| gttggtaaag ggcaagggtg aaaagttgcc cttctgacag atggccgctt ctcaggtggt | 1440 |
| acttatggtc ttgtcgtggg tcatatcgct cctgaagcac aagatggcgg tccaatcgcc | 1500 |
| tacctgcaaa caggagacat agtcactatt gaccaagaca ctaaggaatt acactttgat | 1560 |
| atctccgatg aagagttaaa acatcgtaaa gagaccattg aattgccacc gctctattca | 1620 |
| | |
| cgcggtatcc ttggtaaata tgctcacatc gtttcgtctg cttctagggg agccgtaaca | 1680 |
| gacttttggg agcctgaaga aactggcaaa aaatgtgtc ctggttgctg tggtaagcg | 1740 |
| gccgcgttaa ttcaaatata ttgatatagt tttttaatga gtattgaatc tgtttagaaa | 1800 |
| taatggaata ttatttttat ttatttttt atattattgg tcggctcttt tcttctgaag | 1860 |
| gtcaatgaca aaatgatatg aaggaaataa tgatttttaa aattttacaa cgtaagatat | 1920 |
| ttttacaaaa gcctagctca tcttttgtca tgcactatct tactcacgct tgaaattaac | 1980 |

ggccagtcca ctgcggagtc atttcaaagt catcctaate gatctatcgt ttttgatagc 2040

tcattttgga gttcgcgatt gtcttctgtt attcacaact gttttaattt ttatttcatt 2100

ctggaactct tcgagttctt tgtaaagtct ttcatagttag cttactttat cctccaacat 2160

atttaacttc atgtcaattt cggctcttaa attttccaca tcatcaagtt caacatcatc 2220

ttttaacttg aattttattt ctagctcttc caaccaagcc tcattgctcc ttgatttact 2280

ggtgaaaagt gatacacttt gcgcgcaatc cagggtcaaaa ctttctgca aagaattcac 2340

caattttctg acatcatagt acaatttggt ttgttctccc atcacaattt aatatacctg 2400

atggattctt atgaagcgtt gggtaattga cgtgtcactc tacttcgcct ttttcctac 2460

tccttttagt acggaagaca atgctaataa ataagagggt aataataata ttattaatcg 2520

gcaaaaaaga ttaaacgcca agcgtttaat taccagaaag caaacgtcgt accaatcctt 2580

gaatgcttcc caattgtata ttaagagtca tcacagcaac atattcttgt tattaaatta 2640

attattattg atttttgata ttgtataaaa aaaccaaata tgtataaaaa aagtgaataa 2700

aaaataccaa gtatggagaa atatattaga agtctatagc ttaaa 2745

<210> 34

<211> 99

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 34

tcctttctca attattattt tctactcata acctcagca aaataacaca gtcaaatcaa 60

tcaaagtatg actgacaaaa aaactcttaa agacttaag 99

<210> 35

<211> 77

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 35

gaacattaga atacgtaatc cgcaatgctt ctttcttttc cgtttaacgt atagacttct 60

aatatatttc tccatac 77

<210> 36

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 36

aaacggaaaa gaaagaagca ttgcggatta cgtattctaa tgttc 45

<210> 37

<211> 88

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 37

tatttttcgt tacataaaaa tgcttataaa actttaacta ataattagag attaaatcgc 60

caccttggt aactcgttgt atcatcac 88

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 38

gacttttgga 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

ccaggccaat tcaacagact gtcggc 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

gcattgcgga ttacgtattc taatgttcag gtgctggaag aagagctgct taaccgccgc 60

gcccagggtg aagatccacg ctactttacc ctgcgtcgtc tggatttcgg cggctgtcgt 120

ctttcgtcgg caacgccggt tgatgaagcc tgggacggtc cgctctcctt aaacggtaaa 180

cgtatcgcca cctcttatcc tcacctgtc aagcgttate tgcaccagaa aggcattctt 240

tttaaatcct gcttactgaa cggttctgtt gaagtcgccc cgctgcccgg actggcggat 300

gcgatttgcg atctggtttc caccggtgcc acgctggaag ctaacggcct gcgcgaagtc 360

gaagtattct atcgctcgaa agcctgcctg attcaacgcg atggcgaaat ggaagaatcc 420

aaacagcaac tgatcgacaa actgctgacc cgtattcagg gtgtgatcca ggccgcgcgaa 480

tcaaaataca tcatgatgca cgcaccgacc gaacgtctgg atgaagtcac ggtacctact 540

gagagtgcac cataccacag cttttcaatt caattcatca tttttttttt attctttttt 600

ttgatttcgg tttctttgaa atttttttga ttcggtaatc tccgaacaga aggaagaacg 660

aaggaaggag cacagactta gatttggtata tatacgcata tgtagtgttg aagaaacatg 720

aaattgcccc gtattcttaa cccaactgca cagaacaaaa acctgcagga aacgaagata 780

aatcatgtcg aaagctacat ataaggaacg tgctgtctact catcctagtc ctgttgctgc 840

caagctatth aatatcatgc acgaaaagca aacaaacttg tgtgcttcat tggatgttcg 900

taccaccaag gaattactgg agttagtga agcattaggt cccaaaattt gtttactaaa 960

aacacatgtg gatattctga ctgatttttc catggagggc acagttaagc cgctaaaggc 1020

attatccgcc aagtacaatt ttttactctt cgaagacaga aaatttgctg acattggtaa 1080

tacagtcaaa ttgcagtact ctgcgggtgt atacagaata gcagaatggg cagacattac 1140

gaatgcacac ggtgtggtgg gccaggtat tgttagcggg ttgaagcagg cggcagaaga 1200

agtaacaaag gaacctagag gccttttgat gtttagcagaa ttgtcatgca agggctccct 1260

atctactgga gaatatacta aggggtactgt tgacattgctg aagagcgaca aagattttgt 1320

tatcggtctt attgctcaaa gagacatggg tggaagagat gaaggttacg attggttgat 1380

tatgacaccc ggtgtgggtt tagatgacaa gggagacgca ttgggtcaac agtatagaac 1440

cgtggatgat gtggtctcta caggatctga cattattatt gttggaagag gactatttgc 1500
 aaagggaagg gatgctaagg tagagggtga acgttacaga aaagcaggct gggaagcata 1560
 tttagaaga tgcggccagc aaaactaaaa aactgtatta taagtaaatg catgtatact 1620
 aaactcacia attagagctt caatttaatt atatcagtta ttaccctatg cgggttgaaa 1680
 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggaa attgtaaacg ttaatatatt 1740

gttaaaattc gcgttaaatt ttgtttaa atcagctcattt ttttaaccaat aggccgaaat 1800
 cggcaaaatc tctagagtcg tggaagaaga gctgcttaac cgccgcgccc aggggtgaaga 1860
 tccacgctac ttaccctgc gtcgtctgga ttccggcggc tgcgtctctt cgttggaac 1920
 gccggttgat gaagcctggg acggctccgt ctccttaaac ggtaaacgta tcgccacctc 1980
 ttatcctcac ctgctcaagc gttatctcga ccagaaaggc atctctttta aatcctgctt 2040
 actgaacggt tctgttgaag tcgccccgcg tgcggactg gcggatgcga ttgcatct 2100
 ggtttccacc ggtgccacgc tggaagctaa cggcctgcgc gaagtcgaag ttatctatcg 2160

ctcgaaagcc tgcctgattc aacgcgatgg cgaatggaa gaatccaaac agcaactgat 2220
 cgacaaactg ctgaccgta ttacagggtgt gatccaggcg cgcaatcaa aatacatcat 2280
 gatgcacgca ccgaccgaac gtctggatga agtcattccag tgatgataca acgagttagc 2340
 caaggtg 2347

<210> 42

<211> 80

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 42

cttcgaagaa tataactaaa aatgagcagg caagataaac gaaggcaaag gcattgcgga 60
 ttacgtattc taatgttcag 80

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> primer

<400> 43

cttcgaagaa tataactaaa aatgagcagg caagataaac gaaggcaaag 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 caattagcta agatcatagc 30
 <210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> primer
 <400> 46
 aaaaattgat 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

| | |
|--|------|
| tccattacc gacatttggg cgctatacgt gcatatgttc atgtatgtat ctgtatttaa | 60 |
| aacacttttg tattattttt cctcatatat gtgtataggt ttatacggat gatttaatta | 120 |
| ttacttcacc accctttatt tcaggctgat atcttagcct tgttactagt tagaaaaaga | 180 |
| catttttgct gtcagtcact gtcaagagat tcttttgctg gcatttcttc tagaagcaaa | 240 |
| aagagcgatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca acgcaatatg | 300 |
| gattgtcaga atcataaaa agagaagcaa ataactcctt gtcttgtatc aattgcatta | 360 |
| taatatcttc ttgttagtgc aatatcatal agaagtcac gaaatagata ttaagaaaaa | 420 |
| caaactgtac aatcaatcaa tcaatcatcg ctgaggatgt tgacaaaagc aacaaaagaa | 480 |
| caaaaatccc ttgtgaaaaa cagaggggcg gagcttgttg ttgattgctt agtggagcaa | 540 |
| ggtgtcacac atgtatttgg cattccaggt gcaaaaattg atgcggtatt tgacgcttta | 600 |
| caagataaag gacctgaaat tatcgttggc cggcacgaac aaaacgcagc attcatggcc | 660 |
| caagcagtcg gccgtttaac tggaaaaccg ggagtcgtgt tagtcacatc aggaccgggt | 720 |
| gcctctaact tggcaacagg cctgtcgaca gcgaacactg aaggagaccc tgtcgttgcg | 780 |
| cttgctggaa acgtgatccg tgcagatcgt ttaaaacgga cacatcaatc ttggataat | 840 |
| gcggcgctat tccagccgat taaaaatac agtgtagaag ttcaagatgt aaaaaatata | 900 |
| ccggaagctg ttacaaatgc atttaggata gcgtcagcag ggcaggctgg ggccgctttt | 960 |
| gtgagctttc cgcaagatgt tgtgaatgaa gtcacaaata cgaaaaacgt gcgtgctgtt | 1020 |
| gcagcgccaa aactcggctc tgcagcagat gatgcaatca gtgcggccat agcaaaaatc | 1080 |
| caaacagcaa aacttctgt cgttttggtc ggcatgaaag gcggaagacc ggaagcaatt | 1140 |
| aaagcggttc gcaagctttt gaaaaagggt cagcttccat ttgttgaaac atatcaagct | 1200 |
| gccggtacc tttctagaga tttagaggat caatatattg gccgtatcgg ttgttccgc | 1260 |
| aaccgcctg gcgatttact gctagagcag gcagatgttg ttctgacgat cggctatgac | 1320 |
| ccgattgaat atgatccgaa attctggaat atcaatggag accggacaat tatccattta | 1380 |
| gacgagatta tcgtgacat tgatcatgct taccagcctg atcttgaatt gatcgtgac | 1440 |
| attccgtcca cgatcaatca tatcgaaac gatgctgtga aagtgggaatt tgcagagcgt | 1500 |
| gagcagaaaa tcctttctga tttaaaacaa tatatgcatg aagtgagca ggtgcctgca | 1560 |
| gattggaaat cagacagagc gcacctctt gaaatcgta aagagttgcg taatgcagtc | 1620 |
| gatgatcatg ttacagtaac ttgcgatatc ggttcgcacg ccatttggat gtcacgttat | 1680 |
| ttccgcagct acgagccgtt aacattaatg atcagtaacg gtatgcaaac actcggcgtt | 1740 |
| gcgcttccctt gggcaatcgg cgcttcattg gtgaaaccgg gagaaaaagt ggtttctgtc | 1800 |

| | |
|--|------|
| tctggtagcg gcggtttctt attctcagca atggaattag agacagcagt tcgactaaaa | 1860 |
| gcaccaattg tacacattgt atggaacgac agcacatatg acatggttgc attccagcaa | 1920 |
| ttgaaaaaat ataaccgtac atctgcggtc gatttcggaa atatcgatat cgtgaaatat | 1980 |
| gcggaaagct tcggagcaac tggcttgcgc gtagaatcac cagaccagct ggacagatgtt | 2040 |
| ctgcgtcaag gcatgaacgc tgaaggctct gtcacatcg atgtcccggt tgactacagt | 2100 |
| | |
| gataacatta atttagcaag tgacaagctt ccgaaagaat tcggggaact catgaaaacg | 2160 |
| aaagctctct agttaattaa tcatgtaatt agttatgtca cgcttacatt cacgccctcc | 2220 |
| ccccacatcc gctctaaccg aaaaggaagg agttagacaa cctgaagtct aggtccctat | 2280 |
| ttattttttt atagttaagt tagtattaag aacgttattt atatttcaa tttttctttt | 2340 |
| ttttctgtac agacgcgtgt acgcatgtaa cattatactg aaaaccttgc ttgagaaggt | 2400 |
| tttgggacgc tcgaaggctt taatttgcgg gcggccgctc tagaactagt accacaggtg | 2460 |
| ttgtcctctg aggacataaa atacacaccg agattcatca actcattgct ggagtttagca | 2520 |
| | |
| tatctacaat tgggtgaaat ggggagcgat ttgcaggcat ttgctcggca tgccggtaga | 2580 |
| ggtgtggtca ataagagcga cctcatgcta tacctgagaa agcaacctga cctacaggaa | 2640 |
| agagttactc aagaataaga attttcgttt taaaacctaa gagtcacttt aaaatttgta | 2700 |
| tacacttatt tttttataa cttatttaat aataaaaaac ataaatcata agaaattcgc | 2760 |
| ttactcttaa ttaatcaagc atctaaaaca caaccgttgg aagcgttggga aaccaactta | 2820 |
| gcatacttgg atagagtacc tcttgtgtaa cgagggtggag gtgcaacca actttgttta | 2880 |
| cgttgagcca tttccttacc agagactaat aggtcaatct tgttattatc agcatcaatg | 2940 |
| | |
| ataatctcat cgccgtctct gaccaaccgc ataggaccac cttcagcggc ttcgggaaca | 3000 |
| atgtggccga ttaagaaccg gtgagaacca ccagagaatc taccatcagt caacaatgca | 3060 |
| acatctttac ccaaaccgta acccatcaga gcagaggaag gcttttagcat ttcaggcata | 3120 |
| cctggtagac ctcttgacc ttcatatctg ataacaaca cggttttttc acccttcttg | 3180 |
| atttcacctc tttccaaggc ttcaataaag gcaccttctt cttcgaacac acgtgctcta | 3240 |
| cccttgaagt aagtacctc cttaccggta attttaccca cagctccacc tggtgccaat | 3300 |
| gaaccgtaca gaatttgcaa gtgaccgttg gccttgattg ggtgggagag tggcttaata | 3360 |
| | |
| atctcttgtc cttcaggtag gcttgggtgt tttttgcac gttctgcaa agtgtcacgc | 3420 |
| gtaacagtca ttgtgttacc gtgcaacatg ttgttttcat atagatactt aatcacagat | 3480 |
| tgggtaccac caacgttaat caaatcgcc atgacgtatt taccagaagg tttgaagtca | 3540 |
| ccgatcaatg gtgtagtatc actgattctt tggaaatcat ctggtgacaa cttgacaccc | 3600 |
| gcagagttag caacagccac caaatgcaaa acagcattag tggaccacc ggttgcaacg | 3660 |

| | |
|--|------|
| acataagtaa tggcgttttc aaaagcctct tttgtgagga tatcacgagg taaaataccc | 3720 |
| aattccattg tcttcttgat gtattcacca atgtttgcac actcagctaa cttctccttg | 3780 |
| | |
| gaaacggctg ggaaggaaga ggagtttga atggtcaaac ctagcacttc agcggcagaa | 3840 |
| gccatttgtt tggcagtata cataccacca caagaaccag gacctgggca tgcattgtcc | 3900 |
| acaacatctt ctctttcttc ttcagtgaat tgcttggaat tatattcacc gtaggatttg | 3960 |
| aacgcagaga cgatatcgat gtttttagag atcctgttaa aacctctagt ggagtagtag | 4020 |
| atgtaatcaa tgaagcgga gccaaaagac cagagtagag gcctatagaa gaaactgcga | 4080 |
| tacctttgt gatggctaaa caaacagaca tctttttata tgtttttact tctgtatata | 4140 |
| gtgaagtagt aagtataag cgaatttggc taagaacgtt gtaagtgaac aaggacctc | 4200 |
| | |
| ttttgccttt caaaaaagga ttaaatggag ttaatcattg agatttagtt ttcgttagat | 4260 |
| tctgtatccc taaataactc ctttaccgca cggaaggca caaaagactt gaataatagc | 4320 |
| aaacggccag tagccaagac caaataatac tagagttaac tgatggctctt aaacaggcat | 4380 |
| tacgtggatg actccaagac caatatacaa aatatcgata agttattctt gccaccaat | 4440 |
| ttaaggagcc tacatcagga cagtagtacc attcctcaga gaagaggat acataacaag | 4500 |
| aaaatcgct gaacacctta tataacttag cccgttatg agctaaaaa cttgcaaaa | 4560 |
| tttctatga ataagaatac ttcagacgtg ataaaaattt actttctaac tcttctcacg | 4620 |
| | |
| ctgccctat ctgttcttc gctctaccgt gagaaataaa gcatcgagta cggcagttcg | 4680 |
| ctgtcactga actaaaaca taaggctagt tcgaatgatg aacttgcttg ctgtcaaact | 4740 |
| tctgagttgc cgtgatgtg acactgtgac aataaattca aaccggttat agcggctctc | 4800 |
| tccggtaccg gtctgccac ctccaataga gctcagtagg agtcagaacc tctgcgttg | 4860 |
| ctgtcagtga ctcatccggt tttcgtaagt tgtgcgctg cacatttcgc ccgttccgc | 4920 |
| tcatcttgca gcaggcgga attttcatca cgtcttagga cgcaaaaaa aaataattaa | 4980 |
| tcgtacaaga atcttgga aaaaattgaa aaattttgta taaaaggat gacctactt | 5040 |
| | |
| gactcaatgg cttttacacc cagtattttc cttttccttg tttgttaca ttatagaagc | 5100 |
| aagacaaaa catatagaca acctattcct aggagttata tttttttacc ctaccagca | 5160 |
| tataagtaaa aaactagat gaagggtgtt tacgataaag actgcgatct gagcatcatc | 5220 |
| cagggaaga aggttgctat tataggatat ggttccaag gacacgaca agccttgaac | 5280 |
| ttgaaagatt ctggggtcga cgtgacagta ggtctgtata aaggctgtgc tgatgcagca | 5340 |
| aaggctgaag cacatggctt taaagtcaca gatgttcag cggtgtgtgc tggcgctgat | 5400 |

| | |
|--|------|
| ttagtcatga ttttaattcc agatgaattt caatcgcaat tgtacaaaaa tgaaatagaa | 5460 |
| | |
| ccaaacatta agaagggcgc taccttggcc ttcagtcatg gatttgccat tcattacaat | 5520 |
| caagtagtcc ccagggcaga tttggacgtt attatgattg cacctaaggc tccggggcat | 5580 |
| actgttagga gcgaatttgt taagggtggt ggtattccag atttgatcgc tatataccaa | 5640 |
| gacgttagcg gaaacgctaa gaatgtagct ttaagctacg cagcaggagt tgggtggcggg | 5700 |
| agaacgggta taatagaaac cacttttaaa gacgagactg agacagattt atttggagaa | 5760 |
| caagcgggtc tgtgcggagg aactgttgaa ttggttaaag caggctttga gacgcttgtc | 5820 |
| gaagcagggt acgctcccga aatggcatac ttcgaatgtc tacatgaatt gaagttgata | 5880 |
| | |
| gtagacttaa tgiatgaagg tggtagct aatatgaact attccatttc aaataatgca | 5940 |
| gaatatggtg agtatgtcac cggacctgaa gtcattaacg cagaatcaag acaagccatg | 6000 |
| agaaatgcct tgaaacgtat ccaggacggt gaatacgtta agatgttcat aagtgaaggc | 6060 |
| gctacgggtt acccgaglat gactgctaaa agaagaaaca atgcagcaca tggtagcga | 6120 |
| attattggtg aacagttaag gtctatgatg ccttgatcg gtgctaataa gatcgtagac | 6180 |
| aaggcgaaaa attaaggccc tgcaggccta tcaagtgtg gaaacttttt ctcttggaat | 6240 |
| ttttgcaaca tcaagtcata gtcaattgaa ttgacceaat ttcacattta agattttttt | 6300 |
| | |
| tttttcatcc gacatacatc tgtacactag gaagccctgt ttttctgaag cagcttcaaa | 6360 |
| tatatatatt tttacatat ttattatgat tcaatgaaca atctaattaa atcgaaaaca | 6420 |
| agaaccgaaa cggaataaa taatttatit agatggtagc aagtgtataa gtctcatcg | 6480 |
| ggacagctac gattttcttt tcggttttgg ctgagctact ggttgctgtg acgcagcggc | 6540 |
| attagcgcgg cgttatgagc taccctctgt gcctgaaaga tggcgggaat aaagcggaac | 6600 |
| taaaaattac tgactgagcc atattgaggt caatttgtca actcgtcaag tcacgtttgg | 6660 |
| tggacggccc ctttccaacg aatcgtatat actaacatgc gcgcgcttcc tatatacaca | 6720 |
| | |
| tatacatata tatatatata tatatgtgtg cgtgtatgtg tacacctgta ttttaatttc | 6780 |
| ttactcgcgg gtttttcttt ttttcaatt ctggcttcc tctttctcga gtatataatt | 6840 |
| tttcaggtaa aatttagtac gatagtaaaa tacttctcga actcgtcaca tatacgtgta | 6900 |
| cataatgtct gaaccagctc aaaagaaaca aaaggttgct aacaactctc tagagcggcc | 6960 |
| gcccgcaaat taaagcttc gagcgtccca aaaccttctc aagcaaggtt ttcagtataa | 7020 |
| tgttacatgc gtacacgcgt ctgtacagaa aaaaaagaaa aatttgaaat ataaataacg | 7080 |
| ttcttaatac taacataact ataaaaaaat aaataggac ctagacttca ggttgtctaa | 7140 |

| | |
|--|------|
| ctccttcctt ttcggttaga gcggtatgtg ggggagggcg tgaatgtaag cgtgacataa | 7200 |
| ctaattacat gattaattaa ttattgggtt tctggtctca actttctgac ttccttacca | 7260 |
| acctccaga tttccatgtt tctgatgtg tctaattcct tttctagctt ttctctgtag | 7320 |
| tcaggttag agttgaattc caaagatctc ttggtttcgg taccgttctt ggtagattcg | 7380 |
| tacaagtctt ggaaaacagg cttcaaagca ttcttgaaga ttgggtacca gtccaaagca | 7440 |
| cctcttctgg cgggtgggga acaagcatcg tacatgtaat ccataccgta cttaccgatc | 7500 |
| aatgggtata gagattgggt agcttcttcg acggtttcgt tgaaagcttc agatggggag | 7560 |
| tgaccgtttt ctctcaagac gtcgtattga gccaagaaca taccgtggat accacccatt | 7620 |
| aaacaacctc tttaccgta caagtcagag ttgacttctc tttcgaaagt ggtttggtaa | 7680 |
| acgtaaccgg aaccaatggc aacggccaaa gcttgggcct tttcgtgagc cttaccggtg | 7740 |
| acatcgttcc agacggcgta agaagagtta ataccagac cttccttgaa caaagatctg | 7800 |
| acagtcttac cggaacctt tggagcaacc aagataacat ctaagtcctt tgggtgttca | 7860 |
| acgtgagtca agtccttgaa gactggggag aaaccgtggg agaagtaca agtcttacc | 7920 |
| ttggtcaaca atggcttgat agcaggccag gtttctgatt gagcggcatc ggacaacaag | 7980 |
| ttcataacgt aactacctt cttgatagca tcttcaacag tgaacaagtt cttgcctgga | 8040 |
| acccaaccgt cttcgatggc agccttccaa gaagcaccat ctttacggac accaatgata | 8100 |
| acgttcaaac cgttgtctt caagttcaaa cttgaccgt aaccttgga accgtaaccg | 8160 |
| atcaaagcaa aagtgtcgtt cttgaagtag tccaacaact tttctcttgg ccagtcagct | 8220 |
| ctttcgtaga cggtttcaac agtaccaccg aagttagatt gcttcaacat cctcagctct | 8280 |
| agatttgaat atgtattact tggttatggt tatatatgac aaaagaaaaa gaagaacaga | 8340 |
| agaataacgc aaggaagaac aataactgaa attgatagag aagtattatg tctttgtctt | 8400 |
| tttataataa atcaagtga gaaatccgtt agacaacatg agggataaaa tttaacgtgg | 8460 |
| gcgaagaaga aggaaaaaag tttttgtgag ggcgtaattg aagcgatctg ttgattgtag | 8520 |
| atTTTTTTTT tttgaggagt caaagtcaga agagaacaga caaatggtat taaccatcca | 8580 |
| atactTTTTT ggagcaacgc taagctcatg cttttccatt ggttacgtgc tcagttgtta | 8640 |
| gatatggaaa gagaggatgc tcacggcagc gtgactccaa ttgagcccgaa aagagaggat | 8700 |
| gccacgtttt cccgacggct gctagaatgg aaaaaggaaa aatagaagaa tccattcct | 8760 |
| atcattatTT acgtaatgac ccacacattt ttgagatttt caactattac gtattacgat | 8820 |
| aatcctgctg tcattatcat tattatctat atcgacgtat gcaacgtatg tgaagccaag | 8880 |
| taggcaatta tttagtactg tcagttattgt tattcatttc agatctatcc gcggtggagc | 8940 |
| tcgaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa | 9000 |

| | |
|--|-------|
| cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccg | 9060 |
| accgatcgcc ctccccaa gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgctt gatgcggtat | 9120 |
| ttttctctta cgcattctgt cggtatttca caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtacg | 9180 |
| cgccctgtag cggcgcatia agcgcgggcg gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta | 9240 |
| | |
| cacttgccag cgccttagcg cccgtctctt tcgctttctt ccttctctt ctcgccagct | 9300 |
| tcgccggctt tccccgcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg | 9360 |
| ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggcat | 9420 |
| cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac | 9480 |
| tcttgttcca aactggaaca acactcaact ctatctcggt ctattctttt gatttataag | 9540 |
| ggattttgcc gatttcggtc tatttggtta aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg | 9600 |
| cgaattttta caaaatatia acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct | 9660 |
| | |
| ctgatccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac | 9720 |
| gggcttgtct gctcccgga tccgtttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca | 9780 |
| tgtgtcagag gttttcaccg tcatcacga aacgcgcgag acgaaaggcg ctcgtgatac | 9840 |
| gcctattttt ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt | 9900 |
| ttcggggaaa tgtgcgcgga accctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt | 9960 |
| atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta | 10020 |
| tgagtattca acatttcctg gtgcgcctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttctg | 10080 |
| | |
| tttttgcia ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac | 10140 |
| gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg | 10200 |
| aagaacgttt tccaatgat agcactttta aagtctctgt atgtggcgcg gtattatccc | 10260 |
| gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg | 10320 |
| ttgagtactc accagtaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat | 10380 |
| gcagtctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg | 10440 |
| gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgcttg | 10500 |
| | |
| atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaagca cgagcgtgac accacgatgc | 10560 |
| ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt | 10620 |
| cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct | 10680 |
| cggcccttcc ggcgtgctgg tttattgtg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc | 10740 |
| gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca | 10800 |
| cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtcct | 10860 |

| | |
|---|-------|
| cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt | 10920 |
| | |
| taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga | 10980 |
| ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg gaaaagatca | 11040 |
| aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac | 11100 |
| caccgtacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg | 11160 |
| taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag | 11220 |
| gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac | 11280 |
| cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt | 11340 |
| | |
| taccgataa ggcgacgagg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag ccagcttgg | 11400 |
| agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc | 11460 |
| ttcccgaagg gagaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc | 11520 |
| gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc | 11580 |
| acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa | 11640 |
| acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt | 11700 |
| tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagttagctg | 11760 |
| | |
| ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagtc agtgagcgag gaagcggaag | 11820 |
| agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc | 11880 |
| acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc | 11940 |
| tcactcatta ggcacccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa | 12000 |
| ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttt | 12060 |
| ttctttccaa tttttttttt ttcttcatta taaaaatcat tacgaccgag attcccgggt | 12120 |
| aataactgat ataattaat tgaagctcta atttgtgagt ttagtataca tgcatttact | 12180 |
| | |
| tataatacag ttttttagtt ttgctggccg catcttctca aatatgttc ccagcctgct | 12240 |
| tttctgtaac gttcacctc taccttagca tcccttccct ttgcaaatag tcctcttcca | 12300 |
| acaataataa tgcagatcc tgtagagacc acatcatcca cggttctata ctgttgaccc | 12360 |
| aatgcgtctc cttgtcatc taaaccaca ccgggtgtca taatcaacca atcgtaacct | 12420 |
| tcactcttc caccatgtc tctttgagca ataaagccga taacaaaatc ttgtcgtc | 12480 |
| ttcgcaatgt caacagtacc cttagtatat tctccagtag atagggagcc cttgcatgac | 12540 |
| aattctgcta acatcaaaag gcctctaggt tcctttgtta cttcttctgc cgctgcttc | 12600 |

| | |
|--|-------|
| aaaccgctaa caatacctgg gccaccaca ccgtgtgcat tcgtaatgtc tgcccattct | 12660 |
| gtattctgtg atacaccgcg agagtactgc aatttgactg tattaccaat gtcagcaaat | 12720 |
| tttctgtctt cgaagagtaa aaaattgtac ttggcggata atgccttttag cggtttaact | 12780 |
| gtgccctcca tggaaaaatc agtcaagata tccacatgtg tttttagtaa acaaattttg | 12840 |
| ggacctaagc cttcaactaa ctccagtaat tccttggtgg tacgaacatc caatgaagca | 12900 |
| cacaagtttg tttgcttttc gtgcatgata ttaaataagct tggcagcaac aggactagga | 12960 |
| tgagtagcag cacgttcctt atatgtagct ttcgacatga tttatcttcg tttcctgcag | 13020 |
| | |
| gtttttgttc tgtgcagttg ggtaagaat actgggcaat ttcatgtttc ttcaacacta | 13080 |
| catatgcgta tatataccaa tctaagtcgtg tgctccttcc ttcgttcttc cttctgttcg | 13140 |
| gagattaccg aatcaaaaaa atttcaagga aaccgaaatc aaaaaaaga ataaaaaaa | 13200 |
| aatgatgaat tgaaaagctt gcatgcctgc aggtcgactc tagtatactc cgtctactgt | 13260 |
| acgatacact tccgctcagg tccttgtcct ttaacgaggc cttaccactc tttgtttact | 13320 |
| ctattgatcc agctcagcaa aggcagtggtg atctaagatt ctatcttcgc gatgtagtaa | 13380 |
| aactagctag accgagaaaag agactagaaa tgcaaaaggc acttctacaa tggctgccat | 13440 |
| | |
| cattattatc cgatgtgacg ctgcattttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt | 13500 |
| tttttttttt tttttttgta caaatatcat aaaaaaagag aatcttttta agcaaggatt | 13560 |
| ttcttaactt cttcggcgac agcatcaccg acttcggtgg tactgttga accacctaaa | 13620 |
| tcaccagttc tgatactgc atccaaaacc tttttaactg catcttcaat ggctttacct | 13680 |
| tcttcaggca agttcaatga caatttcaac atcattgcag cagacaagat agtggcgata | 13740 |
| gggttgacct taitctttgg caaatctgga gcggaacat ggcatggttc gtacaaacca | 13800 |
| aatgcggtgt tcttgtctgg caaagaggcc aaggacgcag atggcaacaa acccaaggag | 13860 |
| | |
| cctgggataa cggaggettc atcggagatg atatcaccaa acatgttgct ggtgattata | 13920 |
| ataccattta ggtgggttgg gttcttaact aggatcatgg cggcagaatc aatcaattga | 13980 |
| tgttgaactt tcaatgtagg gaattcgttc ttgatggttt cctccacagt ttttctccat | 14040 |
| aatcttgaag aggccaaaac attagcttta tccaaggacc aaataggcaa tgggtgctca | 14100 |
| tgtttagagg ccatgaaagc ggccattctt gtgattcttt gcacttctgg aacggtgtat | 14160 |
| tgttcactat cccaagcgac accatcacca tcgtcttctt tttctttacc aaagtaata | 14220 |
| cctcccacta attctctaac aacaacgaag tcagtacctt tagcaaattg tggcttgatt | 14280 |
| | |
| ggagataagt ctaaaagaga gtcggatgca aagttacatg gtcttaagtt ggcgtacaat | 14340 |
| tgaagtctct tacggatttt tagtaaacct tgttcaggtc taacactacc ggtaccccat | 14400 |
| ttaggaccac ccacagcacc taacaaaacg gcatcagcct tcttgagggc ttccagcgcc | 14460 |

| | |
|--|-------|
| tcacatcgaa gtggaacacc tgtagcatcg atagcagcac caccaattaa atgattttcg | 14520 |
| aatcgaaact tgacattgga acgaacatca gaaatagctt taagaacctt aatggcttcg | 14580 |
| gctgtgattt cttgaccaac gtggcacct ggcaaacga cgatcttctt aggggcagac | 14640 |
| attacaatgg tatatccttg aaatatatat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa | 14700 |
| | |
| tgcagcttct caatgatatt cgaatacgtt ttgaggagat acagcctaata atccgacaaa | 14760 |
| ctgttttaca gatttacgat cgtacttggt acccatcatt gaattttgaa catccgaacc | 14820 |
| tgggagtttt cctgaaaca gatagtatat ttgaacctgt ataataatat atagtctagc | 14880 |
| gctttacgga agacaatgta tgtatttcgg ttcttgaga aactattgca tctattgcat | 14940 |
| aggtaatctt gcacgtcgca tccccggttc attttctgcg tttccatctt gcacttcaat | 15000 |
| agcatatctt tgtaacgaa gcacgtgtgc ttcatcttgt agaacaaaaa tgcaacgca | 15060 |
| gagcgctaata ttttcaaaca aagaatctga gctgcatctt tacagaacag aatgcaacg | 15120 |
| | |
| cgaaagcgct attttaccaa cgaagaatct gtgcttcatt tttgtaaaac aaaaatgcaa | 15180 |
| cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg | 15240 |
| caacgcgaga gcgtatttt accaacaaag aatctatact tctttttgt tctacaaaaa | 15300 |
| tgcacccga gagcgctatt tttctaaca agcatcttag attactttt tctcctttg | 15360 |
| tgcgctctat aatgcagctt cttgataact ttttgactg taggtccgtt aaggtagaa | 15420 |
| gaaggctact ttggtgtcta ttttctctc cataaaaaa gcctgactcc acttcccgcg | 15480 |
| tttactgatt actagcgaag ctgcgggtgc attttttcaa gataaaggca tccccgatta | 15540 |
| | |
| tattctatac cgatgtggat tgcgcatact ttgtgaacag aaagtgatag cgttgatgat | 15600 |
| tcttcatttg tcagaaaatt atgaacggtt tcttctatct tgtctctata tactacgtat | 15660 |
| aggaaatggt tacatcttcg tattgttttc gattcactct atgaatagtt ctactacaa | 15720 |
| ttttttgtc taaagagtaa tactagagat aaacataaaa aatgtagagg tcgagtttag | 15780 |
| atgcaagtgc aaggagcgaa aggtggatgg gtaggttata tagggatata gcacagagat | 15840 |
| atatagcaaa gagatacttt tgagcaatgt ttgtggaagc ggtattcgca atattttagt | 15900 |
| agctcgttac agtccggtgc gtttttggtt ttttgaaagt gcgtcttcag agcgcttttg | 15960 |
| | |
| gttttcaaaa gcgctctgaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cggaatagga | 16020 |
| acttcaaagc gtttccgaaa acgagcgctt ccgaaaatgc aacgcgagct gcgcacatac | 16080 |
| agctcactgt tcacgtcgca cctatatctg cgtgttgctt gtatataatat atacatgaga | 16140 |
| agaacggcat agtgcgtgtt tatgcttaaa tgcgtactta tatgcgtcta tttatgtagg | 16200 |
| atgaaaggta gtctagtacc tctgtgata ttatccatt ccatgcgggg tatcgtatgc | 16260 |
| ttccttcagc actacccttt agctgttcta tatgctgcca ctcctcaatt ggattagtct | 16320 |

| | |
|--|-------|
| catccttcaa tgctatcatt tcctttgata ttggatcata tgcatagtac cgagaaacta | 16380 |
| gaggatc | 16387 |
| <210> 49 | |
| <211> 448 | |
| <212> DNA | |
| <213> Saccharomyces cerevisiae | |
| <400> 49 | |
| cccattaccg acatttgggc gctatacgtg catatgttca tgtatgtatc tgtattttaa | 60 |
| acacttttgt attatttttc ctcatatatg tgtatagggt tatacggatg atttaattat | 120 |
| tacttcacca ccctttatct caggctgata tcttagcctt gttactagt agaaaaagac | 180 |
| atctttgctg tcagtcactg tcaagagatt cttttgctgg catttcttct agaagcaaaa | 240 |
| agagcgtatg gtcttttccg ctgaaccgtt ccagcaaaaa agactaccaa cgcaatatgg | 300 |
| attgtcagaa tcatataaaa gagaagcaaa taactccttg tcttgtatca attgcattat | 360 |
| aatatcttct tgtagtgca atatcatata gaagtcacg aaatagatat taagaaaaac | 420 |
| aaactgtaca atcaatcaat caatcatc | 448 |
| <210> 50 | |
| <211> 250 | |
| <212> DNA | |
| <213> Saccharomyces cerevisiae | |
| <400> 50 | |
| ccgcaaatta aagccttcga gcgtcccaaa accttctcaa gcaagggttt cagtataatg | 60 |
| ttacatgcgt acacgcgtct gtacagaaaa aaaagaaaaa ttgaaatat aaataacgtt | 120 |
| cttaatacta acataactat aaaaaataa ataggacgt agacttcagg ttgtctaact | 180 |
| ccttcctttt cggtttagagc ggatgtgggg ggagggcgtg aatgtaagcg tgacataact | 240 |
| aattacatga | 250 |
| <210> 51 | |
| <211> 1181 | |
| <212> DNA | |
| <213> Saccharomyces cerevisiae | |
| <400> 51 | |
| taaaacctct agtggagtag tagatgtaat caatgaagcg gaagccaaaa gaccagagta | 60 |
| gaggcctata gaagaaactg cgataccttt tgtgatggct aaacaaacag acatcttttt | 120 |

atatgttttt acttctgtat atcgtgaagt agtaagtat aagcgaattt ggctaagaac 180
 gttgtaagtg aacaaggac ctcttttgcc ttccaacaaa ggattaaatg gagttaatca 240

 ttgagattta gttttcgta gattctgtat ccctaaataa ctcctttacc cgacgggaag 300
 gcacaaaaga ctigaataat agcaaacggc cagtagccaa gaccaaataa tactagagtt 360
 aactgatggt cttaaacagg cattacgtgg tgaactccaa gaccaatata caaaatatcg 420
 ataagttatt cttgcccacc aatttaagga gcctacatca ggacagtagt accattcctc 480
 agagaagagg tatacataac aagaaaatcg cgtgaacacc ttatataact tagcccgta 540
 ttgagctaaa aaaccttgca aaatttcta tgaataagaa tacttcagac gtgataaaaa 600
 ttactttct aactcttctc acgtgcccc taictgttct tccgtctac cgtgagaaat 660

 aaagcatcga gtacggcagt tcgctgtcac tgaactaaaa caataaggct agttcgaatg 720
 atgaacttgc ttgctgtcaa acttctgagt tgccgtgat gtgacactgt gacaataaat 780
 tcaaaccggt tatagcggtc tcctccggtc ccggttctgc cacctccaat agagctcagt 840
 aggagtcaga acctctgcgg tggctgtcag tgactcatcc gcgtttcgta agttgtgcgc 900
 gtgcacattt cgcccgttcc cgctcatctt gcagcaggcg gaaattttca tcacgtgta 960
 ggacgcaaaa aaaaaataat taatcgtaca agaactctgg aaaaaaatt gaaaaatatt 1020
 gtataaaagg gatgacctaa cttgactcaa tgctttttac acccagtatt ttccctttcc 1080

 ttgtttgtta caattataga agcaagacaa aaacatatag acaacctatt cctaggagtt 1140
 atattttttt accctaccag caatataagt aaaaaactag t 1181

 <210> 52
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 52

 ggccctgcag gcctatcaag tgctggaaac tttttctctt ggaatttttg caacatcaag 60
 tcatagtcaa ttgaattgac ccaatttcac atttaagatt tttttttttt catccgacat 120
 acatctgtac actaggaagc cctgtttttc tgaagcagct tcaaatatat atatttttta 180
 catattttatt atgattcaat gaacaatcta attaaatcga aaacaagaac cgaaacgcga 240

 ataaataatt tatttagatg gtgacaagt tataagtcct catcgggaca gctacgattt 300
 ctctttcgggt ttggctgag ctactggttg ctgtgacgca gcggcattag cgcggcgta 360
 tgagctaccc tcgtggcctg aaagatggcg ggaataaagc ggaactaaaa attactgact 420
 gagccatatt gaggtcaatt tgtcaactcg tcaagtcacg ttggtggac ggcccccttc 480

caacgaatcg tatatactaa catgcgcgcg ctctctatat acacatatat atatatatat 540
atatatatat gtgtgcgtgt atgtgtacac ctgtatttaa tttccttact cgcgggtttt 600
tcttttttct caattcttgg ctctctcttt ctcgagtata taatttttca ggtaaaaatt 660

agtacgatag taaaatactt ctggaactcg tcacatatat gtgtacataa tgtctgaacc 720
agctcaaaag aaacaaaagg ttgctaacaa ctctctaga 759

<210> 53
<211> 643
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<400> 53

gaaatgaata acaatactga cagtactaaa taattgccta ctggccttca catacgttgc 60
atacgtcgat atagataata atgataatga cagcaggatt atcgtaatac gtaatagttg 120
aaaatctcaa aaatgtgtgg gtcattacgt aaataatgat aggaatggga ttcttctatt 180
tttctttttt ccattctagc agccgtcggg aaaacgtggc atctctcttt tcgggctcaa 240

ttggagtcac gctgccgtga gcacctcttc tttccatata taacaactga gcacgtaacc 300
aatggaaaag catgagctta gcgttgctcc aaaaaagtat tggatggtta ataccatttg 360
tctgttctct tctgactttg actctcmeta aaaaaaaaaat ctacaatcaa cagatcgctt 420
caattacgcc ctcaaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa ttttatccct 480
catgttgtct aacggatttc tgcacttgat ttattataaa aagacaaaga cataatactt 540
ctctatcaat ttcagttatt gttcttcctt gcgttattct tctgttcttc tttttctttt 600
gtcatatata accataacca agtaatacat attcaaatct aga 643

<210> 54
<211> 270
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<400> 54

gacctcgagt catgtaatta gttatgtcac gcttacattc acgccctccc cccacatccg 60
ctctaaccga aaaggaagga gttagacaac ctgaagtcta ggctccctatt tattttttta 120
tagttatgtt agtattaaga acgttattta tatttcaaatt ttttcttttt tttctgtaca 180
gacgcgtgta cgcatgtaac attatactga aaaccttgct tgagaaggtt ttgggacgct 240
cgaaggcttt aatttgcggc cggtacccaa 270

<210> 55

<211> 15539

<212> DNA

<213>

> artificial sequence

<220><223> constructed plasmid

<400> 55

| | |
|---|------|
| tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca | 60 |
| cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg | 120 |
| ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc | 180 |
| accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgctagga gtcactgcca ggtatcggtt | 240 |
| gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta | 300 |
| ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat | 360 |
| | |
| ttttttttt ccacctagcg gatgactctt ttttttctt agcgattggc attatcacat | 420 |
| aatgaattat acattatata aagtaatgtg atttcttga agaataact aaaaaatgag | 480 |
| caggcaagat aaacgaaggc aaagatgaca gagcagaaag ccctagtaaa gcgtattaca | 540 |
| aatgaaacca agattcagat tgcgatctct ttaaagggtg gtcccctagc gatagagcac | 600 |
| tcgatcttcc cagaaaaaga ggcagaagca gtagcagaac aggccacaca atcgcaagtg | 660 |
| attaacgtcc acacaggtat agggtttctg gaccatatga tacatgctct ggccaagcat | 720 |
| tccggctggt cgtaaatcgt tgagtgcatt ggtgacttac acatagacga ccatcacacc | 780 |
| | |
| actgaagact gcgggattgc tctcggtcaa gcttttaaag aggccctagg ggccgtgcgt | 840 |
| ggagtaaaaa ggittggatc aggatttgcg cctttggatg aggcactttc cagagcgggtg | 900 |
| gtagatcttt cgaacaggcc gtacgcagtt gtcgaacttg gtttgcaaag ggagaaagta | 960 |
| ggagatctct cttgcgagat gatcccgcat tttcttgaag gctttgcaga ggctagcaga | 1020 |
| attaccctcc acgttgattg tctgcgaggc aagaatgac atcacgtag tgagagtgcg | 1080 |
| ttcaaggctc ttgcggttgc cataagagaa gccacctcgc ccaatggtac caacgatgtt | 1140 |
| ccctccacca aagggttctt tatgtagtga caccgattat ttaaagctgc agcatacgat | 1200 |
| | |
| atatacatat gtgtatatat gtatactat gaatgtcagt aagtatgtat acgaacagta | 1260 |
| tgatactgaa gatgacaagg taatgcatca ttctatacgt gtcattctga acgaggcgcg | 1320 |
| ctttctttt ttctttttgc tttttcttt tttttctctt gaactcgacg gatctatgcg | 1380 |
| gltgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggaaat tgtaagcgtt | 1440 |
| aatatattgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gtcattttt taaccaatag | 1500 |
| gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt | 1560 |

gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga 1620

aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacat caccctaatac aagttttttg 1680

gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct 1740

tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc 1800

gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt 1860

aatgcgccgc tacagggcgc gtccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 1920

gcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 1980

ttaagtggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagttag 2040

cgcgcgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgac 2100

ggcgcgccac tggtagagag cgactttgta tgccccaatt gcgaaaccg cgatatcctt 2160

ctcgattctt tagtaccga ccaggacaag gaaaaggagg tcgaaacgtt tttgaagaaa 2220

caagaggaac tacacggaag ctctaaagat ggcaaccagc cagaaactaa gaaaatgaag 2280

ttgatggatc caactggcac cgctggcttg aacaacaata ccagccttcc aacttctgta 2340

aataacggcg gtacgccagt gccaccagta ccgttacctt tcggtatacc tcctttcccc 2400

atgtttccaa tgccttcat gcctccaacg gctactatca caaatcctca tcaagctgac 2460

gcaagcccta agaatgaat aacaatactg acagtactaa ataattgcct acttggttc 2520

acatacgttg catacgtga tatagataat aatgataatg acagcaggat tatcgtaata 2580

cgtaatatgt gaaaatctca aaaatgtgtg ggctattacg taaataatga taggaatggg 2640

attcttctat ttttctttt tccattctag cagccgtcgg gaaaacgtgg catcctctct 2700

ttcgggctca atiggagta cgctgccgtg agcatcctct ctttccatat ctaacaactg 2760

agcacgtaac caatggaaaa gcatgagctt agcgttgctc caaaaaagta ttggatggtt 2820

aataccattt gtctgttctc ttctgacttt gactcctcaa aaaaaaaat ctacaatcaa 2880

cagatcgctt caattacgcc ctacaaaaa cttttttcct tcttcttcgc ccacgttaaa 2940

ttttatccct catgttgtct aacggatttc tgcaattgat ttattataaa aagacaaaga 3000

cataatactt ctctatcaat ttacgttatt gttcttccct gcgttattct tctgttcttc 3060

tttttctttt gtcatatata accataacca agtaatacat attcaacta gtatgactga 3120

caaaaaaact cttaaagact taagaaatcg tagttctgtt tacgattcaa tggttaaatc 3180

acctaactgt gctatgttc gtgcaactgg tatgcaagat gaagactttg aaaaacctat 3240

cgtcggtgtc atttcaactt gggctgaaaa cacacctgt aatatccact tacatgactt 3300

| | |
|---|------|
| tggtaaacta gccaaagtcg gtgttaagga agctgggtgct tggccagttc agttcggaac | 3360 |
| aatcacgggtt tctgatggaa tcgccatggg aacccaagga atcgctttct ccttgacatc | 3420 |
| tcgtgatatt attgcagatt ctattgaagc agccatggga ggtcataatg cggatgcttt | 3480 |
| tgtagccatt ggcggttggtg ataaaaacat gcccgggttct gttatcgcta tggctaacat | 3540 |
| ggatacceca gccatttttg cttacggcgg aacaattgca cctggtaatt tagacggcaa | 3600 |
| agatatcgat ttagtctctg tctttgaagg tgcgggcat tgggaaccag gcgatatgac | 3660 |
| caaagaagaa gttaaagctt tggaatgtaa tgcttgtccc ggtcctggag gctgcggtgg | 3720 |
| | |
| tatgtatact gctaacacaa tggcgacagc tatigaagtt ttgggactta gccttccggg | 3780 |
| ttcatcttct caccggctg aatccgcaga aaagaaagca gatattgaag aagctggtcg | 3840 |
| cgctgtgtgc aaaatgctcg aaatgggctt aaaaccttct gacattttaa cgcgtgaagc | 3900 |
| ttttgaagat gctattactg taactatggc tctgggaggt tcaaccaact caaccttca | 3960 |
| cctcttagct attgccatg ctgctaattg ggaattgaca cttgatgatt tcaatacttt | 4020 |
| ccaagaaaaa gttcctcatt tggctgattt gaaaccttct ggtcaatatg tattccaaga | 4080 |
| cctttacaag gtcggagggg taccagcagt tatgaaatat ctcttaaaa atggcttct | 4140 |
| | |
| tcatggtgac cgtatcactt gtactggcaa aacagtcgct gaaaatttga aggcttttga | 4200 |
| tgatttaaca cctgggtcaaa aggttattat gccgcttgaa aatcctaaac gtgaagatgg | 4260 |
| tccgctcatt attctccatg gtaacttggc tcagacggg gccgttgcca aagtttctgg | 4320 |
| tgtaaaagtg cgtcgtcatg tcggctctgc taaggctttt aattctgaag aagaagccat | 4380 |
| tgaagctgtc ttgaatgatg atattgttga tggatgatgt gttgtcgtac gttttgtagg | 4440 |
| accaaagggc ggtcctggta tgcctgaaat gctttccctt tcatcaatga ttgttggtaa | 4500 |
| agggcaaggt gaaaaagttg ccctctgac agatggccgc ttctcaggtg gtacttatgg | 4560 |
| | |
| tcttgtcgtg ggtcatatcg ctctgaagc acaagatggc ggtccaatcg cctacctgca | 4620 |
| aacaggagac atagtacta ttgaccaaga cactaaggaa ttacactttg atatctccga | 4680 |
| tgaagagtta aaacatcgtc aagagacat tgaattgcca ccgctctatt cacgcggtat | 4740 |
| ccttggtaaa tatgctcaca tcgtttcgtc tgcttctagg ggagccgtaa cagacttttg | 4800 |
| gaagcctgaa gaaactggca aaaaatgttg tcctggttgc tgtggttaag cggccgcgtt | 4860 |
| aattcaaatt aattgatata gttttttaat gattattgaa tctgtttaga aataatggaa | 4920 |
| tattattttt attattttat ttatattatt ggtcggctct tttcttctga aggtcaatga | 4980 |
| | |
| caaatgata tgaaggaaat aatgatttct aaaattttac aacgtaagat atttttacaa | 5040 |
| aagcctagct catcttttgt catgcactat ttactcacg cttgaaatta acggccagtc | 5100 |
| cactgcggag tcatttcaaa gtcaccta taatctatc gtttttgata gctcattttg | 5160 |

gagttcgcga ttgtcttctg ttattcacaa ctgttttaaat ttttatttca tcttggaact 5220

cttcgagttc ttgttaaagt ctttcatagt agcttacttt atcctccaac atatttaact 5280

tcatgtcaat ttcggctctt aaattttcca catcatcaag ttcaacatca tcttttaact 5340

tgaatttatt ctctagctct tccaaccaag cctcattgct ccttgattta ctggtgaaaa 5400

gtgatacact ttgcgcgcaa tccagggtcaa aacttttctg caaagaattc accaatttct 5460

cgacatcata gtacaatttg ttttgttctc ccatcacaat ttaatatacc tgatggattc 5520

ttatgaagcg ctgggtaatg gacgtgtcac tctacttcgc ctttttcctt actcctttta 5580

gtacggaaga caatgctaataaataagagg gtaataataa tattattaat cggcaaaaaa 5640

gattaaacgc caagcgttta attatcagaa agcaaacgtc gtaccaatcc ttgaatgctt 5700

cccaattgta tattaagagt catcacagca acatatctt gttattaaat taattattat 5760

tgatttttga tattgtataa aaaaaccaa tatgtataaa aaaagtgaat aaaaaatacc 5820

aagtatggag aaatatatta gaagtctata cgtaaacca cccgggcccc cctcagagg 5880

cgacggtatc gataagcttg atatcgaatt cctgcagccc gggggatcca ctagtcttag 5940

agcggccgct ctagaactag taccacaggt gttgtcctct gaggacataa aatacacacc 6000

gagattcatc aactcattgc tggagttagc atatctacaa ttgggtgaaa tggggagcga 6060

tttgcaggca tttgctcggc atgccggtag aggtgtggtc aataagagcg acctcatgct 6120

atactgaga aagcaacctg acctacagga aagagttact caagaataag aattttcgtt 6180

ttaaaccta agagtcactt taaaatttgi atacacttat ttttttata acttatttaa 6240

taataaaaat cataaatcat aagaaattcg ctactctta attaatcaaa aagttaaaat 6300

tgtacgaata gattcaccac ttcttaacaa atcaaacctt tcattgattt tctcgaatgg 6360

caatacatgt gtaattaaag gatcaagagc aaacttcttc gccataaagt cggcaacaag 6420

ttttggaaca ctatccttgc tcttaaaacc gccaaatata gctcccttcc atgtacgacc 6480

gcttagcaac agcataggat tcatcgacaa attttgtgaa tcaggaggaa cacctacgat 6540

cacactgact ccatatgcct cttagacagca ggacaacgca gttacatag tatcaagacg 6600

gcctataact tcaaaagaga aatcaactcc accgtttgac atttcagtaa ggacttcttg 6660

tattggtttc ttataatctt gagggttaac acattcagta gccccgacct ccttagcttt 6720

tgcaaatitg tcttatttga tgtctacacc tataatcttc gctgcgctg cagctttaca 6780

ccccataata acgcttagtc ctactcctcc taaaccgaat actgcacaag tcgaaccctg 6840

tgtaaccttt gcaactttta ctgcggaacc gtaaccggtg gaaaatccgc accctatcaa 6900

gcaaaccttt tccagtgttg aagctgcac gattttagcg acagatatct cgtccaccac 6960

tgtgtattgg gaaaatgtag aagtaccaag gaaatggtgt ataggtttcc ctctgcatgt 7020

| | |
|--|------|
| aaatctgctt gtaccatcct gcatagtacc tctaggcata gacaaatcat ttttaaggca | 7080 |
| | |
| gaaattaccc tcaggatgtt tgcagactct acacttacca cattgaggag tgaacagtgg | 7140 |
| gatcacttta tcaccaggac gaacagtggc aacaccttca cctatggatt caacgattcc | 7200 |
| ggcagcctcg tgtcccgcga ttactggcaa aggagtaact agagtggcac tcaccacatg | 7260 |
| gtcgtcggat ctacagattc cgggtggcaac catcttgatt ctaacctcgt gtgcttttgg | 7320 |
| tggcgtact tctacttctt ctatgctaaa cggttttttc tcttcccaca aaactgccgc | 7380 |
| tttacttta ataactttac cggctgttga catcctcagc tagctattgt aatatgtgtg | 7440 |
| tttgttttga ttattaagaa gaataattac aaaaaaatt acaaaggaag gtaattacaa | 7500 |
| | |
| cagaattaag aaaggacaag aaggaggaag agaatcagtt cattatttct tctttgttat | 7560 |
| ataacaaacc caagtagcga tttggccata cattaaaagt tgagaaccac cctccctggc | 7620 |
| aacagccaca actcgttacc attgttcac acgatcatga aactcgtgt cagctgaaat | 7680 |
| ttcacctcag tggatctctc tttttattct tcatcgttcc actaaccttt tccatcagc | 7740 |
| tggcagggaa cggaaagtgg aatcccatth agcgagcttc ctcttttctt caagaaaaga | 7800 |
| cgaagcttgt gtgtgggtgc gcgcgctagt atctttccac attaagaaat ataccataaa | 7860 |
| ggttacttag acatcactat ggctatatat atatatatat atatatgtaa cttagcacca | 7920 |
| | |
| tcgcgctgc atcactgcat gtgttaaccg aaaagtittg cgaacacttc accgacacgg | 7980 |
| tcatttagat ctgtcgtctg cattgcacgt cccttagcct taaatcctag gcgggagcat | 8040 |
| tctcgtgtaa ttgtgcagcc tgcgtagcaa ctcaacatag cgtagtctac ccagtttttc | 8100 |
| aagggtttat cgttagaaga ttctcccttt tcttctgtct cacaatctt aaagtcatac | 8160 |
| attgcacgac taaatgcaag catgcggatc ccccggtgtg caggaattcg atatcaagct | 8220 |
| tatcgatacc gtcgactggc cattaatctt tcccatatta gatttcgcca agccatgaaa | 8280 |
| gttcaagaaa ggtcttttaga cgaattaccc ttcatttctc aaactggcgt caagggatcc | 8340 |
| | |
| tggtaggtt ttatcgtttt atttctggtt cttatagcat cgttttgac ttctctgttc | 8400 |
| ccattaggcg gttcaggagc cagcgagaa tcattctttg aaggatactt atcctttcca | 8460 |
| atattgattg tctgttacgt tggacataaa ctgtatacta gaaattggac tttagatgtg | 8520 |
| aaactagaag atatggaatc tgataccggc agaaaacaag tagatttgac tcttcgtagg | 8580 |
| gaagaaatga ggattgagcg agaaacatta gcaaaaagat ccttcgtaac aagattttta | 8640 |
| catttctggt gtigaaggga aagatatgag ctatacagcg gaatttccat atcactcaga | 8700 |
| ttttgttate taattttttc cttcccacgt ccgcgggaat ctgtgtatat tactgcatct | 8760 |

| | |
|--|-------|
| agatatatgt taicttatct tggcgcgtac atttaatttt caacgtattc tataagaaat | 8820 |
| tgcgggagtt tttttcatgt agatgatact gactgcacgc aaatatagc atgatttata | 8880 |
| ggcatgattt gatggctgta ccgataggaa cgctaagagt aacttcagaa tcgtttactt | 8940 |
| ggcggaaaaa attcatttgt aaacttttaa aaaaaagcc aatatccca aaattattaa | 9000 |
| gagcgctcc attattaact aaaatttcac tcagcatcca caatgtatca ggtatctact | 9060 |
| acagatatta catgtggcga aaaagacaag aacaatgcaa tagcgcatca agaaaaaca | 9120 |
| caaagctttc aatcaatgaa tcgaaaatgt cattaaaata gtatataaat tgaaactaag | 9180 |
| | |
| tcataaagct ataaaaagaa aattttatta aatgcaagat ttaaagtaaa ttcacggccc | 9240 |
| tgcaggcctc agctcttgtt ttgttctgca aataacttac ccatcttttt caaaacttta | 9300 |
| ggtgcaccct cctttgctag aataagttct atccaataca tcctatttgg atctgcttga | 9360 |
| gcttctttca tcacggatac gaattcattt tctgttctca caattttgga cacaactctg | 9420 |
| tcttccgttg ccccgaaact ttctggcagt tttagtaat tccacatagg aatgtcatta | 9480 |
| taactctggt tcggaccatg aatttccctc tcaaccgtgt aaccatcgtt attaagata | 9540 |
| aagcagattg ggtttatctt ctctctaagt gctagtccca attcttggac agtcagttgc | 9600 |
| | |
| aatgatccat ctccgataaa caataaatgt ctagattctt tatctgcaat ttggctgcct | 9660 |
| agagctgcgg ggaaagtgtg tcctatagat ccccaagagg gttgaccaat aaaatgtgat | 9720 |
| ttcgatttca gaaatataga tgaggcaccg aagaaagaag tgccttggtc agccacgac | 9780 |
| gtctcattac ttgggtcaa attttcgaca gcttgccaca gtctatcttg tgacaacagc | 9840 |
| gcgttagaag gtacaaaac tctttgcttt ttatctatgt acttgccctt atattcaatt | 9900 |
| tcggacaagt caagaagaga tgatacagg gattcgaagt cgaaattttg gattctttcg | 9960 |
| ttgaaaattt taccttcacg gatattcaag gaaatcattt tattttcatt aagatggtga | 10020 |
| | |
| gtaaatgcac ccgtactaga atcggtaac tttacacca acataagaat aaaatcagca | 10080 |
| gattccaca attccttcaa gtttggtctt gacagagtac cgttgtaaat ccccaaaat | 10140 |
| gagggaatg cttcatcaac agatgattta ccaaagtcca aagtagtaat aggtactta | 10200 |
| gtctttgaaa taaactgagt aacagtcttc tctaggccga acgatataat ttcattggcct | 10260 |
| gtgattaca ttggtttctt ggcatcttc agactttcct gtattttgtt cagaatctct | 10320 |
| tgatcagatg tattcgactg ggaattttcc ttcttaagag gcaaggatgg tttttcagcc | 10380 |
| ttagcggcag ctacatctac aggtaaattg atgtaaaccg gctttctttc ctttagtaag | 10440 |
| | |
| gcagacaaca ctctatcaat ttcaacagtt gcattctcgg ctgtcaataa agtcctggca | 10500 |
| gcagtaaccg gttcgtgcat cttcataaag tgettgaat caccatcagc caacgtatgg | 10560 |
| tgaacaaact taccttcgtt ctgcactttc gaggtaggag atcccacgat ctcaacaaca | 10620 |

| | |
|---|-------|
| ggcaggttct cagcatagga gcccgctaag ccattaactg cggataattc gccaacacca | 10680 |
| aatgtagtca agaatgccgc agcctttttc gttcttgcgt acccgtcggc catataggag | 10740 |
| gcatttaact cattagcatt tcccacccat ttcatacttt tgtgtgaaat aatttgatct | 10800 |
| agaaattgca aattgtagtc acctggfact ccgaatatit cttctatacc taattcgtgt | 10860 |
| | |
| aatctgtcca acagatagtc acctactgta tacattttgt ttactagttt atgtgtgttt | 10920 |
| attcgaaact aagtcttgg tggttttaaaa ctaaaaaaaa gactaactat aaaagtagaa | 10980 |
| tttaagaagt ttaagaaata gatttacaga attacaatca atacctaccg tctttatata | 11040 |
| cttattagtc aagtagggga ataatttcag ggaactggtt tcaacctttt ttttcagctt | 11100 |
| tttccaaatc agagagagca gaaggtataa gaaggtgtaa gaaaatgaga tagatacatg | 11160 |
| cgtgggtcaa ttgccttgtg tcatcattta ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg | 11220 |
| ttgtgcccgt tttttgcctg tttgtgcccc tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga | 11280 |
| | |
| cctatgaact gatggttggg gaagaaaaca atattttggg gctgggattc ttttttttc | 11340 |
| tggatgccag cttaaaaagc gggctccatt atatttagtg gatgccagga ataaactgtt | 11400 |
| caccagaca cctacgatg tatatattct gtgtaaccgc cccctatit tgggcatgta | 11460 |
| cgggttacag cagaattaaa aggctaattt ttgactaaa taaagttagg aaaatcacta | 11520 |
| ctattaatta ttacgtatt ctttgaaatg gcagtattga taatgataaa ctcgaaactga | 11580 |
| aaaagcgtgt tttttattca aaatgattct aactccctta cgtaatcaag gaatctttt | 11640 |
| gccttggcct ccgcgtcatt aaacttcttg ttgttgacgc taacattcaa cgctagtata | 11700 |
| | |
| tattcgtttt tttcaggtaa gttcttttca acgggtctta ctgatgaggc agtcgcgtct | 11760 |
| gaacctgtta agaggtaaaa tatgtcttct tgaccgtacg tgtcttgcgt gttattagct | 11820 |
| ttgggaattt gcatcaagtc ataggaaaat ttaaatcttg gctctcttgg gctcaagggtg | 11880 |
| acaaggtcct cgaanaatagg gcgcgccccca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt | 11940 |
| tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat | 12000 |
| tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg | 12060 |
| ggtgcctaata gattgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag | 12120 |
| | |
| tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcgccc aacgcgcggg gagaggcggg | 12180 |
| ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgtc ggtcgttcgg | 12240 |
| ctgcggcgag cggatcagc tcactcaaag gcggtataac gggtatccac agaatacagg | 12300 |
| gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag | 12360 |
| gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga | 12420 |
| cgctcaagtc agagggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct | 12480 |

| | |
|--|-------|
| ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc | 12540 |
| | |
| tttctccctt cggaagcgt ggcgtttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg | 12600 |
| gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaaccgc | 12660 |
| tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca | 12720 |
| ctggcagcag cacttgtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag | 12780 |
| ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct | 12840 |
| ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc | 12900 |
| accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga | 12960 |
| | |
| tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca | 13020 |
| cgtaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat | 13080 |
| taaaaatgaa gttttaaat aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac | 13140 |
| caatgcttaa tcagtgagc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt | 13200 |
| gcctgactcc ccgtcgtga gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt | 13260 |
| gtgcaatga taccgcgaga ccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag | 13320 |
| ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgtt cctgcaactt tatccgctc catccagtct | 13380 |
| | |
| attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttccag ttaatagttt gcgcaacgtt | 13440 |
| gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc | 13500 |
| tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgtgtgcaa aaaagcggtt | 13560 |
| agctccttcg gtccctccgat cgttctcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg | 13620 |
| gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat cgtgaagatg cttttctgtg | 13680 |
| actggtgagt actcaacca gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gagttgctct | 13740 |
| tgcccggt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgcctatc | 13800 |
| | |
| attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt | 13860 |
| tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt | 13920 |
| tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg | 13980 |
| aaatgttgaa tactcatact cttcctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat | 14040 |
| tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg | 14100 |
| cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa cgaagcatct gtgcttcatt ttgtagaaca | 14160 |
| aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca aacaaagaat ctgagctgca tttttacaga | 14220 |

| | |
|--|-------|
| acagaaatgc aacgcgaaag cgctatttta ccaacgaaga atctgtgctt catTTTTgtA | 14280 |
| aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt tttcaacaa agaactgtag ctgcattttt | 14340 |
| acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta ttttaccac aaagaatcta tacttctttt | 14400 |
| ttgttctaca aaaatgcatc ccgagagcgc tatttttcta acaaagcatc ttagattact | 14460 |
| ttttttctcc tttgtgcgct ctataatgca gtctcttgat aactttttgc actgtaggtc | 14520 |
| cgtaagggtt agaagaaggc tactttgggtg tctattttct cttccataaa aaaagcctga | 14580 |
| ctccacttcc cgcgtttact gattactagc gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa | 14640 |
| | |
| ggcatcccg attatattct ataccgatgt ggattgcgca tactttgtga acagaaagt | 14700 |
| atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa aattatgaac ggtttcttct attttgtctc | 14760 |
| tataactac gtataggaaa tgtttacatt ttcgtattgt tttcgattca ctctatgaat | 14820 |
| agttcttact acaatTTTT tgtctaaaga gtaatactag agataaacat aaaaaatgta | 14880 |
| gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag cgaagggtgg atgggtaggt tatataggga | 14940 |
| tatagcacag agatatatag caaagagata cttttgagca atgtttgtgg aagcgttatt | 15000 |
| cgcaatattt tagtagctcg ttacagtccg gtgcgttttt ggTTTTtga aagtgcgtct | 15060 |
| | |
| tcagagcgct ttTggTTTT aaaagcgctc tgaagttcct atactttcta gagaatagga | 15120 |
| acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc gaaaacgagc gcttccgaaa atgcaacgcg | 15180 |
| agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt cgcacctata tctgcgtgtt gcctgtatat | 15240 |
| atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg tgtttatgct taaatgcgta cttatatgcg | 15300 |
| tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag tacctcctgt gatattatcc cattccatgc | 15360 |
| ggggtatcgt atgttctct cagcactacc ctttagctgt tctatatgct gccactctc | 15420 |
| aattggatta gtctcatcct tcaatgctat catttccttt gatattggat catactaaga | 15480 |
| | |
| aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cttttcgtc | 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 ccggtaaagt tattaagtgt aaagcggcag ttttgtggga agagaaaaag | 60 |
| ccgtttagca tagaagaagt agaagtagcg ccacaaaaag cacacgaggt tagaatcaag | 120 |
| atggttgcca ccggaatctg tagatccgac gaccatgtgg tgagtggcac tctagttact | 180 |

cctttgccag taatcgcggg acacgaggct gccggaatcg ttgaatccat aggtgaaggt 240

 gttaccactg ttcgtcctgg tgataaagt atccactgt tcactcctca atgtggtgaag 300
 tgtagagtct gcaaacatcc tgagggtaat ttcgtcctta aaaatgattt gtctatgcct 360
 agaggtacta tgcaggatgg tacaagcaga ttacatgca gagggaaacc tatacaccat 420
 ttccttggta ctctacatt ttccaatac acagtgggtg acgagatc tgctgctaaa 480
 atcgatgcag cttcaccact ggaaaaagt tgcttgatag ggtgcggatt ttccaccggt 540
 tacggttccg cagttaaagt tgcaaaggt acacagggt cgacttgtgc agtattcggt 600
 ttaggaggag taggactaag cgttattatg ggtgttaaag ctgcaggcgc agcgaggatt 660

 atagggttag acatcaataa ggacaaattt gcaaaagcta aggaggtcgg ggctactgaa 720
 tgtgttaacc ctcaagatta taagaaacca atacaagaag tccttactga aatgtcaaac 780
 ggtggagtgt atttctcttt tgaagttata ggccgtcttg atactatggt aactgcgttg 840
 tcctgtctgc aagaggcata tggagtcagt gtgatcgtag gtgttcctcc tgattcacia 900
 aatttgcga tgaatcctat gctgttgcta agcggtcgta catggaagg agctatattt 960
 ggcggtttta agagcaagga tagtgttcca aaacttggtt ccgactttat ggcaagaag 1020
 ttgtctcttg atcctttaat tacacatgta ttgccattcg agaaaatcaa tgaagggttt 1080

 gatttgtaa gaagtggga 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 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 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

| | |
|---|------|
| tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca | 60 |
| cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg | 120 |
| ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc | 180 |
| accataccac agcttttcaa ttcaattcat cttttttttt ttattctttt ttttgatttc | 240 |
| ggtttctttg aaattttttt gattcggtaa tctccgaaca gaaggaagaa cgaaggaagg | 300 |
| agcacagact tagattggta tatatacgca tatgtagtgt tgaagaaaca tgaaattgcc | 360 |
| cagtattctt aacccaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatcatgt | 420 |
| cgaaagctac atataaggaa cgtgtgtgta ctcatcctag tcctgttgct gccaaagctat | 480 |
| ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact tgtgtgcttc attggatgtt cgtaccacca | 540 |
| aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaat ttgtttacta aaaacacatg | 600 |
| tggatatctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa gccgctaaag gcattatccg | 660 |
| ccaagtacaa ttttttactc ttcgaagaca gaaaatttgc tgacattgggt aatacagtca | 720 |
| aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg ggcagacatt acgaatgcac | 780 |
| acggtgtggt gggcccagggt attgttagcg gtttgaagca ggcggcagaa gaagtaacaa | 840 |
| aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg caagggtcc ctatctactg | 900 |
| gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gtatcggct | 960 |
| ttattgtcga aagagacatg ggtggaagag atgaaggtaa cgattggttg attatgacac | 1020 |
| ccggtgtggg tttagatgac aaggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg | 1080 |

| | |
|--|------|
| atgtggtctc tacaggatct gacattattia ttgttggaag aggactatit gcaaagggaa | 1140 |
| | |
| gggatgctaa ggtagagggt gaacgttaca gaaaagcagg ctgggaagca tatttgagaa | 1200 |
| gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa tgcatgtata ctaaactcac | 1260 |
| aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt tattacccta tgcggtgtga aataccgcac | 1320 |
| agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat | 1380 |
| tcgctttaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcgcaaaaa | 1440 |
| tcccttataa atcaaaagaa tagaccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttgaaca | 1500 |
| agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg | 1560 |
| | |
| gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccct aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta | 1620 |
| aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg gaaaagccgg | 1680 |
| cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa | 1740 |
| gtgtagcggg cagctgcgc gtaaccacca caccgcgc gcttaatgcg ccgctacagg | 1800 |
| gcgcgtcgcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgca tcggtcggg | 1860 |
| cctcttcgtt attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagtggg | 1920 |
| taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaacgac ggccagttag cgcgcgtaat | 1980 |
| | |
| acgactcact ataggcgaa ttgggtaccg ggccccccct cgaggtcgac tggccattaa | 2040 |
| tctttcccat attagatttc gccaaagccat gaaagttaa gaaaggcttt tagacgaatt | 2100 |
| acccttcatt tctcaactg gcgtcaaggg atcctggtat ggttttatcg ttttatttct | 2160 |
| ggttcttata gcatcgtttt ggacttctct gttccatta ggcggttcag gagccagcgc | 2220 |
| agaatcattc ttigaaggat acttatcctt tccaattttg attgtctgtt acgttgaca | 2280 |
| taaactgtat actagaaatt ggactttgat ggtgaaacta gaagatatgg atcttgatac | 2340 |
| cggcagaaaa caagtagatt tgactcttcg tagggaagaa atgaggattg agcgagaaac | 2400 |
| | |
| attagcaaaa agatccttcg taacaagatt ttacatttc tgggtgtgaa gggaaagata | 2460 |
| tgagctatac agcggaattt ccatacact cagattttgt tatctaattt ttctctccc | 2520 |
| acgtccgagg gaatctgtgt atattactgc atctagatat atgttatctt atcttgccgc | 2580 |
| gtacatttaa tttcaacgt attctataag aaattgcggg agtttttttc atgtagatga | 2640 |
| tactgactgc acgcaaatat aggcattgatt tataggcatg atttgatggc tgtaccgata | 2700 |
| ggaacgctaa gagtaacttc agaatcgtaa tcctggcgga aaaaattcat ttgtaactt | 2760 |
| taaaaaaaaa agccaatatc cccaaaatta ttaagagcgc ctccattatt aactaaaatt | 2820 |

| | |
|--|------|
| tcactcagca tccacaatgt atcaggtatc tactacagat attacatgtg gcgaaaaaga | 2880 |
| caagaacaat gcaatagcgc atcaagaaaa aacacaaagc tttcaatcaa tgaatcgaaa | 2940 |
| atgtcattaa aatagtatat aaattgaaac taagtcataa agctataaaa agaaaattta | 3000 |
| tttaaagtca agatttaaag taaattcacg gccctgcagg ccctaacctg ctaggacaca | 3060 |
| acgtctttgc ctggtaaagt ttctagctga cgtgattcct tcacctgtgg atccggcaat | 3120 |
| tgtaaagggt gtgaaacct cagcttcata accgacacct gcaaatgact ttgcattctt | 3180 |
| aacaaagata gtigtatcaa ttccacgttc gaatctatta aggttatcga tgttcttaga | 3240 |
| | |
| ataaatgtag gcggaatgtt ttctattctg ctacagctatc ttggcgtatt taatggcttc | 3300 |
| atcaatgtcc ttactctaa ctataggcaa aattggcatc atcaactccg tcataacgaa | 3360 |
| cggatggttt gcgttgactt cacaataat acactttaca ttacttgggtg actctacatc | 3420 |
| tatttcaccc aaaaacagtt tagcgtctct accaacccac ttcttattaa tgaaatattc | 3480 |
| ttgagtttca ttgttctttt gaagaacaag gtctatcagc ttggatactt ggtcttcatt | 3540 |
| gataatgacg gcgttgtttt tcaacatgtt agagatcaga tcacttgcaa cgttttcaaa | 3600 |
| cacgaacact tctttttccg cgatacaagg aagattgttg tcaaacgaac aaccttcaat | 3660 |
| | |
| aatgcttctg ccggccttct cgatatctgc tgtatcgtct acaataaccg gaggattacc | 3720 |
| cgcgccagct ccgatggcct ttttaccaga attaagaagg gtttttacca taccggggcc | 3780 |
| acccgtaccg cacaacaatt ttatggatgg atgtttgata atagcgtcta aactttccat | 3840 |
| agttgggttc ttatagtag tgacaagggt ttccaggtcca ccacagctaa ttatggcttt | 3900 |
| gtttatcatt tctactgcga aagcgacaca ctttttggcg catgggtgac cattaaatac | 3960 |
| aactgcattc cccgcagcta tcatacctat agaattgcag ataacggttt ctgttggatt | 4020 |
| cgtgcttga gttatagcgc cgataactcc gtatggactc atttcaacca ctgttagtcc | 4080 |
| | |
| attatcgccg gaccatgctg ttgttgtcag atcttcagtg cctggggtat acttggccac | 4140 |
| taattcatgt ttcaagattt taccctcata ccttcccatg tgggtttcct ccaggatcat | 4200 |
| tgtggctaag acctctttat tctgtaatgc ggcttttctt atttcggtga ttattttctc | 4260 |
| tctttgttcc ttgtgtagt gtagggaaaag aatcttttgt gcatgtactg cagaagaaat | 4320 |
| ggcattctca acattttcaa atactccaaa acatgaagag ttatctttgt aattctttaa | 4380 |
| gttgatgttt tcaccattag tcttcacttt caagtctttg gtggttggga ttaaggtatc | 4440 |
| tttatccatg gtgtttgttt atgtgtgttt attcgaaact aagtcttgg tgttttaaaa | 4500 |
| | |
| ctaaaaaaaa gactaactat aaaagtagaa ttaagaagt ttaagaaata gatttacaga | 4560 |
| attacaatca atacctaccg tctttatata cttattagtc aagtagggga ataatttcag | 4620 |
| ggaactgggt tcaacctttt ttttcagctt ttccaaatc agagagagca gaaggtaata | 4680 |

| | |
|--|------|
| gaagggtgtaa gaaaatgaga tagatacatg cgtgggtcaa ttgccttgtg tcatcattta | 4740 |
| ctccaggcag gttgcatcac tccattgagg ttgtgcccggt ttttgcctg tttgtgcccc | 4800 |
| tgttctctgt agttgcgcta agagaatgga cctatgaact gatggttggg gaagaaaaca | 4860 |
| atattttggt gctgggattc ttttttttc tggatgccag cttaaaaagc gggctccatt | 4920 |
| | |
| atatttagtg gatgccagga ataaactgtt caccagaca cctacgatgt tatatattct | 4980 |
| gtgtaaccgg cccctattt tgggcatgta cgggttacag cagaattaaa aggctaattt | 5040 |
| tttgactaaa taaagttagg aaaatcacta ctattaatta tttacgtatt ctttgaaatg | 5100 |
| gcagtattga taatgataaa ctgcaactga aaaagcgtgt tttttattca aaatgattct | 5160 |
| aactccctta cgtaatcaag gaatcttttt gccttggcct ccgcgtcatt aaacttcttg | 5220 |
| ttgttgacgc taacattcaa cgctagtata tttcgtttt tttcaggtaa gttcttttca | 5280 |
| acgggtctta ctgatgaggc agtcgcgtct gaacctgtta agaggtcaaa tatgtcttct | 5340 |
| | |
| tgaccgtacg tgccttgcag gttattagct ttgggaattt gcatcaagtc ataggaaaat | 5400 |
| ttaaatcttg gctctcttgg gctcaagggtg acaaggctct cgaaaatagg gcgcgcccc | 5460 |
| ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa | 5520 |
| tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata | 5580 |
| ggagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgaggta actcacatta | 5640 |
| attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgttgcca gctgcattaa | 5700 |
| tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg | 5760 |
| | |
| ctcactgact cgtcgcgtc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag | 5820 |
| gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa | 5880 |
| ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc | 5940 |
| cgccccctg acgagcatca caaaaaatga cgtcgaagtc agagggtggcg aaaccgaca | 6000 |
| ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgtc tcctgttccg | 6060 |
| acctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cggaagcgt ggcgctttct | 6120 |
| catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt | 6180 |
| | |
| gtgcacgaac cccccgttca gcccagccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag | 6240 |
| tccaaccggg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtta caggattagc | 6300 |
| agagcgagggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac | 6360 |
| actagaagga cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaga | 6420 |
| gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgtggta gcggtggttt ttttgtttgc | 6480 |
| aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg | 6540 |

gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gagattatca 6600

aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 6660

atataatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtggagc acctatctca 6720

gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 6780

atacgggagg gcttaccatc tggcccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 6840

ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc 6900

cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt 6960

agttcgccag ttaatatgtt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca 7020

cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 7080

tgatccccc tggtgtgcaa aaaagcgggt agtccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 7140

agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 7200

gtcatcccat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgag actcaaccaa gtcattctga 7260

gaatagtgtg tgcggcgacc gagggtgtct tgcggcggt caatacggga taataccgcg 7320

ccacatagca gaactttaaa agtgcctc attggaatac gttcttcggg gcgaaaactc 7380

tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 7440

tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 7500

gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctccctttt 7560

caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7620

atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa 7680

cgaagcatct gtgcttcatt ttgtagaaca aaaatgcaac gcgagagcgc taatttttca 7740

aacaaagaat ctgagctgca tttttacaga acagaaatgc aacgcgaaag cgctatttta 7800

ccaacgaaga atctgtgctt cttttttgta aaacaaaaat gcaacgcgag agcgctaatt 7860

tttcaacaa agaacttgag ctgcattttt acagaacaga aatgcaacgc gagagcgcta 7920

ttttaccaac aaagaatcta tacttctttt ttgttctaca aaaatgcac ccgagagcgc 7980

tatttttcta acaaagcatc ttagattact tttttctcc tttgtgcgt ctataatgca 8040

gtctcttgat aactttttgc actgtaggtc cgtaagggtt agaagaaggc tactttggtg 8100

tctattttct ctccataaa aaaagcctga ctccacttc cgcgtttact gattactagc 8160

gaagctgcgg gtgcattttt tcaagataaa ggcatcccc atttatattct ataccgatgt 8220

ggattgcgca tacttttgta acagaaagtg atagcgttga tgattcttca ttggtcagaa 8280

aattatgaac ggtttcttct attttgtctc tatatactac gtataggaaa tgtttacatt 8340
 ttcgtattgt tttcgattca ctctatgaat agttcttact acaatTTTTT tgcTaaaga 8400
 gtaatactag agataaacat aaaaaatgta gaggtcgagt ttagatgcaa gttcaaggag 8460
 cgaaagggtg atgggtaggt tataataggga tatagcacag agatataatag caaagagata 8520
 cttttgagca atgtttgtgg aagcggtatt cgcaatattt tagtagctcg ttacagtcgg 8580
 gtgcgttttt ggTTTTTga aagtgcgtct tcagagcgct tttggttttc aaaagcgctc 8640
 tgaagttcct atactttcta gagaatagga acttcggaat aggaacttca aagcgtttcc 8700

gaaaacgagc gcttccgaaa atgcaacgag agctgcgcac atacagctca ctgttcacgt 8760
 cgcacctata tctgcgtgtt gcctgtatat atatatacat gagaagaacg gcatagtgcg 8820
 tgtttatgct taaatgcgta cttatatgag tctatttatg taggatgaaa ggtagtctag 8880
 tacctcctgt gatattatcc cattccatgc ggggtatcgt atgcttctt cagcactacc 8940
 ctttagctgt tctatatgct gccactctc aattggatta gtctcatcct tcaatgctat 9000
 catttcttt gatattggat catactaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 9060
 aaataggcgt atcacgagge cctttcgtc 9089

<210> 59

<211> 672

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 59

agttcgagtt tatcattatc aatactgcca ttcaaagaa tacgtaaata attaatagta 60
 gtgattttcc taactttatt tagtcaaaaa attagccttt taattctgct gtaaccgta 120
 catgccccaa atagggggcg ggttacacag aatatataac atcgtagggtg tctgggtgaa 180
 cagttttattc ctggcatcca ctaaataataa tggagcccg cttttaagct ggcatccaga 240
 aaaaaaaga atcccagcac caaaatattg tttcttcac caaccatcag ttcataggtc 300
 cattctctta gcgcaactac agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc 360

tcaatggagt gatgcaacct gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gaccacgca 420
 tgtatctatc tcatTTTctt acaccttcta ttacctctg ctctctctga tttggaaaaa 480
 gtgaaaaaa aaggttgaaa ccagttccct gaaattattc ccctacttga ctaataagta 540
 tataaagacg gtaggtattg attgtaattc tgtaaacta tttcttaaac ttcttaatt 600
 ctacttttat agttagtctt ttttttagtt ttaaaacacc aagaacttag tttcgaataa 660
 acacacataa ac 672

<210> 60

<211> 1023

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 60

```
caccgcggtg gggcgcgccc tattttcgag gaccttgta ccttgagccc aagagagcca      60
agatttaaat tttcctatga cttgatgcaa attcccaaag ctaataacat gcaagacacg      120
tacgggtcaag aagacatatt tgacctctta acaggttcag acgcgactgc ctcacagta      180
agaccggttg aaaagaactt acctgaaaaa aacgaatata tactagcggtt gaatgttagc      240
gtcaacaaca agaagtttaa tgacgcggag gccaaaggcaa aaagattcct tgattacgta      300
aggaggttag aatcattttg aataaaaaac acgtttttc agttcgagtt tatcattatc      360
aatactgcca ttcaaagaa tacgtaaata attaatagta gtgatattcc taactttatt      420
```

```
tagtcaaaaa attagccttt taattctgct gtaaccgta catgccaaa atagggggcg      480
ggttacacag aatatataac atcgtagggtg tctgggtgaa cagtttatc ctggcatcca      540
ctaaataata tggagccgcg tttttaagct ggcatccaga aaaaaaaga atcccagcac      600
caaaatattg ttttcttcac caaccatcag ttcatagggtc cattctctta gcgcaactac      660
agagaacagg ggcacaaaca ggcaaaaaac gggcacaacc tcaatggagt gatgcaacct      720
gcctggagta aatgatgaca caaggcaatt gaccacgca tgtatctatc tcattttctt      780
acaccttcta ttacctctg ctctctctga tttggaaaaa gctgaaaaaa aaggttgaaa      840
```

```
ccagttccct gaaattatc ccctacttga ctaataagta tataaagacg gtaggtattg      900
attgtaattc tgtaaatcta tttcttaaac ttcttaaatt ctacttttat agttagtctt      960
tttttagttt ttaaacacc aagaacttag tttcgaataa 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 ttatgtgtgt ttattcgaaa ctaagttctt ggtg 44

<210> 63

<211> 8994

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> constructed plasmid

<400> 63

ctagtcttag agcggccgcc accgcggtgg agctccagct tttgttcctt ttagtgaggg 60

ttaattgcgc gcttggcgta atcatgggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg 120

ctcacaattc cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa 180

tgagtgaggt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac 240

ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt 300

gggcgcctct ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga 360

gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 420

ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 480

ctggcggtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt 540

cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc 600

ctcgtgcgct ctctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc cttttccct 660

tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgtgttaggt atctcagttc ggtgttaggtc 720

gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 780

tccggttaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 840

gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 900

tgggtgccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 960

ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaac caccgtggt 1020

agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcga gaaaaaagg atctcaagaa 1080

gataccttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg 1140

attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga 1200

agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta 1260

atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc 1320
cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 1380
ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatattatcag caataaacca gccagccgga 1440
agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt 1500

tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 1560
gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggatatgg cttcattcag ctccggttcc 1620
caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc 1680
ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat ggttatggca 1740
gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag 1800
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgccggcg 1860
tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa 1920

cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 1980
cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt tcttggtga 2040
gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgtga 2100
atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg 2160
agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt 2220
ccccgaaaag tgccacctga acgaagcatc tgtgttcat tttgtagaac aaaaatgcaa 2280
cgcgagagcg ctaatttttc aaacaagaa tctgagctgc atttttacag aacagaaatg 2340

caacgcgaaa gcgtatttt accaacgaag aatctgtgct tcatttttgt aaaacaaaa 2400
tgcaacgcga gagcgctaatt ttttcaaaca aagaatctga gctgcatttt tacagaacag 2460
aatgcaacg cgagagcgct attttacaa caaagaatct atacttcttt ttgttctac 2520
aaaaatgcat cccgagagcg ctatttttct aacaaagcat cttagattac ttttttctc 2580
ctttgtgcgc tctataatgc agtctcttga taacttttg cactgtaggt ccgttaaggt 2640
tagaagaagg ctacttttgt gtctattttc tcttcataa aaaaagcctg actccacttc 2700
ccgcgtttac tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa aggcaccccc 2760

gattatattc tataccgatg tggattgcgc atactttgtg aacagaaagt gatagcgttg 2820
atgattcttc attggtcaga aaattatgaa cgttttcttc tattttgtct ctatatacta 2880
cgatataggaa atgtttacat tttcgtattg ttttcgattc actctatgaa tagttcttac 2940
tacaattttt ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt agaggtcgag 3000
tttagatgca agttcaagga gcgaaagggt gatgggtagg ttatataggg atatagcaca 3060
gagatatata gcaaagagat acttttgagc aatgtttgtg gaagcgggtat tcgcaatatt 3120

| | |
|--|------|
| ttagtagctc gttacagtcc ggtgcgtttt tggttttttg aaagtgcgtc ttcagagcgc | 3180 |
| | |
| ttttggtttt caaaagcgtc ctgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa | 3240 |
| taggaacttc aaagcgtttc cgaaaacgag cgcttcgaa aatgcaacgc gagctgcgca | 3300 |
| catacagctc acgtttcacg tcgcacctat atctgcgtgt tgcctgtata tatatataca | 3360 |
| tgagaagaac ggcatagtgc gtgtttatgc ttaaatgcgt acttatatgc gtctatttat | 3420 |
| gtaggatgaa aggtagtcta gtacctcctg tgatattatc ccattccatg cggggtatcg | 3480 |
| tatgcttctt tcagcactac cctttagctg ttctatatgc tgccactcct caattggatt | 3540 |
| agtctcatcc ttcaatgcta tcatttctct tgatattgga tcatactaag aaaccattat | 3600 |
| | |
| tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg taccacgagg ccccttcgtc tcgcgcgttt | 3660 |
| cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct | 3720 |
| gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg | 3780 |
| tcggggctgg cttaaciatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatcga | 3840 |
| ctacgtcgta aggccgtttc tgacagagta aaattcttga gggaactttc accattatgg | 3900 |
| gaaatgcttc aagaaggtat tgacttaaac tccatcaaat ggtcaggtca ttgagtgttt | 3960 |
| tttatttggt gtattttttt ttttttagag aaaatcctcc aatatcaaat taggaatcgt | 4020 |
| | |
| agtttcatga ttttctgtta cacctaactt tttgtgttgt gccctcctcc ttgtcaatat | 4080 |
| taatgttaaa gtgcaattct ttttctttat caggttgagc cattagtatc aatttgctta | 4140 |
| cctgtattcc tttactatcc tcttttttct ccttcttgat aaatgtatgt agattgcgta | 4200 |
| tatagtttcg tctacctat gaacatattc cattttgtaa tttcgtgtcg ttctatttat | 4260 |
| gaatttcatt tataaagttt atgtacaaat atcataaaaa aagagaatct ttttaagcaa | 4320 |
| ggattttctt aactttctcg gcgacagcat caccgacttc ggttggtactg ttggaaccac | 4380 |
| ctaaatcacc agttctgata cctgcatcca aaaccttttt aactgcatct tcaatggcct | 4440 |
| | |
| taccttcttc aggcaagttc aatgacaatt tcaacatcat tgcagcagac aagatagtgg | 4500 |
| cgatagggtc aaccttattc tttggcaaat ctggagcaga accgtggcat ggttcgtaca | 4560 |
| aaccaaagtc ggtgttcttg tctggcaaag aggccaagga cgcagatggc aacaaaccca | 4620 |
| aggaacctgg gataacggag gcttcacgag agatgatatc accaaacatg ttgctggtga | 4680 |
| ttataatacc atttaggtgg gttgggttct taactaggat catggcggca gaatcaatca | 4740 |
| attgatgttg aaccttcaat gtagggaatt cgttcttgat ggtttcctcc acagtttttc | 4800 |
| tccataatct tgaagaggcc aaaagattag ctttatccaa ggaccaaata ggcaatggtg | 4860 |

gctcatgttg tagggccatg aaagcggcca ttcttgtgat tctttgact tctggaacgg 4920
 tgtattgttc actatcccaa gcgacaccat caccatcgtc ttcctttctc ttaccaaagt 4980
 aaatacctcc cactaattct ctgacaacaa cgaagtcagt accttagca aattgtggct 5040
 tgattggaga taagtctaaa agagagtcgg atgcaaagtt acatgggtctt aagttggcgt 5100
 acaattgaag ttctttacgg atttttagta aaccttggtc aggtctaaca ctaccgtac 5160
 cccatttagg accagccaca gcacctaa aaacggcatc aaccttcttg gaggttcca 5220
 gcgcctcatc tggaagtggg acacctgtag catcgatagc agcaccacca attaatgat 5280

 tttcgaaatc gaacttgaca ttggaacgaa catcagaaat agctttaaga acctaatgg 5340
 cttcggctgt gatttcttga ccaacgtggt cacctggcaa aacgacgac ttcctagggg 5400
 cagacatagg ggcagacatt agaattggtat atccttgaaa tataatatata tattgctgaa 5460
 atgtaaaagg taagaaaagt tagaaagtaa gacgattgct aaccacctat tggaaaaaac 5520
 aataggtcct taaataatat tgtcaacttc aagtattgtg atgcaagcat ttagtcatga 5580
 acgttctct atcttatatg aaaagccggt tccggcctct cacctttcct ttttctcca 5640
 atttttcagt tgaaaaaggt atatgcgtca ggcgacctct gaaattaaca aaaaatttcc 5700

 agtcacgaa ttgattctg tgcgatagcg ccctgtgtg ttctcgttat gttgaggaaa 5760
 aaaataatgg ttgctaagag attcgaactc ttgcatctta cgatacctga gtattccac 5820
 agttaactgc ggtcaagata tttcttgaat caggcgctt agaccgctcg gccaaacaac 5880
 caattacttg ttgagaaata gagtataatt atcctataaa tataacgttt ttgaacacac 5940
 atgaacaagg aagtacagga caattgattt tgaagagaat gtggattttg atgtaattgt 6000
 tgggattcca tttttaataa ggcaataata ttaggtatgt ggatatacta gaagtctcc 6060
 tcgaccgtcg atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 6120

 aggaaattgt aaacgttaat attttgttaa aattcgctt aaatttttgt taaatcagct 6180
 catttttta ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg 6240
 agatagggtt gagtgttgtt ccagtttga acaagagtcc actattaaag aacgtggact 6300
 ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac 6360
 cctaataag ttttttggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga 6420
 gccccgatt tagagcttga cggggaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga 6480
 aagcgaaagg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca 6540

 ccacaccgc cgcgttaat gcgccgtac agggcgctc gcgccattcg ccattcaggc 6600
 tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 6660
 aagggggatg tgctgcaagg cgattaagt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 6720

gttgtaaac gacggccagt gagcgcgct aatacgactc actatagggc gaattgggta 6780
ccgggcccc cctcagagtc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccc 6840
ggggatccgc atgcttgcat ttagtcgtgc aatgtatgac ttttaagattt gtgagcagga 6900
agaaaaggga gaatcttcta acgataaacc ctgaaaaac tgggtagact acgctatgtt 6960

gagttgctac gcaggctgca caattacacg agaatgctcc cgcctaggat ttaaggctaa 7020
gggacgtgca atgcagacga cagatctaaa tgaccgtgtc ggtgaagtgt tcgccaaact 7080
tttcggttaa cacatgcagt gatgcacgcg cgatgggtgct aagttacata tatatatata 7140
tatatatata tagccatagt gatgtctaag taacctttat ggtatatattc ttaatgtgga 7200
aagatactag cgcgcgcacc cacacacaag ctctgtcttt tcttgaagaa aagaggaagc 7260
tcgctaaatg ggattccact ttccgttccc tgccagctga tggaaaaagg ttagtggaac 7320
gatgaagaat aaaaagagag atccactgag gtgaaatttc agctgacagc gagtttcatg 7380

atcgtgatga acaatggtaa cgagttgtgg ctgttgccag ggagggtggt tctcaacttt 7440
taatgtatgg ccaaatcgtc acttgggttt gttatataac aaagaagaaa taatgaactg 7500
attctcttcc tecttcttgt cttttcttaa ttctgttgta attaccttcc ttigtatttt 7560
tttttgtaat tattcttctt aataatccaa acaaacacac atattacaat agctagctga 7620
ggatgaaggc attagtttat catggggatc aaaaaattc gttagaagac aaacaaaaac 7680
ccactctgca gaaaccaaca gacgttgtgg ttaggggtgtt gaaaacaaca atttgcggta 7740
ctgacttggg aatatacaaa ggtaagaatc ctgaagtggc agatggcaga atcctgggtc 7800

atgagggcgt tggcgtcatt gaagaagtgg gcgaatccgt gacacaattc aaaaaggggg 7860
ataaagtttt aatctcctgc gttactagct gtggatcgtg tgattattgc aagaagcaac 7920
tgtattcaca ctgtagagac ggtggctgga ttttaggtta catgatcgac ggtgtccaag 7980
ccgaatacgt cagaatacca catgctgaca attcattgta taagatcccg caaactatcg 8040
atgatgaaat tgcagtacta ctgtccgata ttttacctac tggacatgaa attggtgttc 8100
aatatggtaa cgttcaacca ggcatgctg tagcaattgt aggagcaggt cctgttggaa 8160
tgtcagtttt gtttaactgt caattttact cgcctagtac cattattgtt atcgacatgg 8220

acgaaaaccg tttaacaatta gcgaaggagc ttggggccac acacactatt aactccggtta 8280
ctgaaaatgt tgtcgaagct gtgcatcgta tagcagccga aggagtggat gtagcaatag 8340
aagctgttgg tataccgcga acctgggaca tctgtcagga aattgtaaaa cccggcgctc 8400
atattgcaa cgtgggagtt catggtgtta aggtggactt tgaaattcaa aagttgtgga 8460
ttaagaatct aaccatcacc actggttttg ttaacactaa tactacceca atgttgatga 8520
aggtagcctc tactgataaa ttgcctttta agaaaatgat tactcacagg tttgagttag 8580

ctgaaatcga acacgcatat caggttttct tgaatggcgc taaagaaaaa gctatgaaga 8640

ttattctatc taatgcaggt gccgcctaataa taattaagag taagcgaatt tcttatgatt 8700

tatgatTTTT attattaaat aagttataaa aaaaataagt gtatacaaat tttaaagtga 8760

ctcttaggtt ttaaacgaa aattcttatt cttagtaac tcttcctgt aggtcaggtt 8820

gctttctcag gtatagcatg aggtcgtctt tattgaccac acctctaccg gcatgccgag 8880

caaatgcctg caaatcgctc cccatttcac ccaattgtag atatgctaac tccagcaatg 8940

agttgatgaa tctcgggtgtg tattttatgt cctcagagga caacacctgt ggta 8994

<210> 64

<211> 753

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 64

gcatgcttgc atttagtctg gcaatgtatg actttaagat ttgtgagcag gaagaaaagg 60

gagaatcttc taacgataaa cccctgaaaa actgggtaga ctacgctatg ttgagttgct 120

acgcaggctg cacaattaca cgagaatgct cccgcctagg atttaaggct aaggacgtg 180

caatgcagac gacagatcta aatgacctg tcggtgaagt gttcgccaaa cttttcggtt 240

aacacatgca gtgatgcacg cgcgatgggt ctaagttaca tataatatata tatagccata 300

gtgatgtcta agtaaccttt atggtatatt tcttaatgtg gaaagatact agcgcgcgca 360

cccacacaca agcttcgtct tttcttgaag aaaagaggaa gctcgctaaa tgggattcca 420

ctttcgttc cctgccagct gatggaaaaa ggtagtgga acgatgaaga ataaaaagag 480

agatccactg aggtgaaatt tcagctgaca gcgagtttca tgatcgtgat gaacaatggt 540

aacgagttgt ggctgttgcc agggaggggtg gttctcaact tttaatgtat ggccaaatcg 600

ctacttgggt ttgttatata acaaagaaga aataatgaac tgattctctt cctccttctt 660

gtccttctt aattctgttg taattacctt cctttgtaat ttttttgta attattcttc 720

ttaataatcc aaacaaacac acatattaca ata 753

<210> 65

<211> 316

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 65

gagtaagcga atttcttatg atttatgatt tttattatta aataagttat aaaaaaata 60

agtgtataca aatitttaaag tgactcttag gttttaaaac gaaaattctt attcttgagt 120
 aactctttcc ttaggtcag gttgctttct caggtatagc atgaggtcgc tcttattgac 180
 cacacctcta ccggcatgcc gagcaaatgc ctgcaaatcg ctccccattt cacccaattg 240
 tagatatgct aactccagca atgagttgat gaatctcggg gtgtatttta tgcctcaga 300
 ggacaacacc tgttgt 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
 cagagctttc atcctcagct agctattgta atatgtgtg 39
 <210> 68
 <211> 9491
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220><223> constructed plasmid
 <400> 68
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accataaatt cccgttttaa gagcttgggtg agcgctagga gtcactgccg ggtatcgttt 240
 gaacacggca ttagtcaggg aagtcataac acagtccttt cccgcaattt tctttttcta 300
 ttactcttgg cctcctctag tacactctat atttttttat gcctcggtaa tgattttcat 360
 tttttttttt cccctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca ttatcacata 420
 atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatata aaaaatgagc 480

aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaaagc cctagtaaag cgtattacaa 540

atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg atagagcact 600

cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa tcgcaagtga 660

ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg gccaaagcatt 720

ccggctggtc gctaatacgtt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac catcacacca 780

ctgaagactg cgggattgct ctcggtcaag cttttaaaga ggccctactg gcgcgtggag 840

taaaaaggtt tggatcagga tttgcgcctt tggatgaggc actttccaga gcggtggtag 900

atctttcgaa caggccgtac gcagttgtcg aacttggttt gcaaaggag aaagtaggag 960

atctctcttg cgagatgac cgcattttt ttgaaagctt tgcagaggct agcagaatta 1020

ccctccacgt tgattgtctg cgaggcaaga atgatcatca ccgtagttag agtgcgttca 1080

aggctcttgc ggttgccata agagaagcca cctcgcccaa tggtagcaac gatgttccct 1140

ccaccaaagg tgttcttatg tagtgacacc gattatttaa agctgcagca tacgatatat 1200

atacatgtgt atatatgtat acctatgaat gtcagtaagt atgtatacga acagtatgat 1260

actgaagatg acaaggtaat gcatcattct atacgtgtca ttctgaacga ggcgcgcttt 1320

ccttttttct ttttgctttt tcttttttt tctcttgaac tcgacggatc tatgcggtgt 1380

gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggaaattgta aacgttaata 1440

ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg 1500

aaatcgga aatcccttat aatcaaaag aatagaccga gataggggtt agtgttgttc 1560

cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa 1620

ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggtt 1680

cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag ccccgattt agagcttgac 1740

ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaaag aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta 1800

ggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgc gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg 1860

cgccgtaca gggcgctcg gcgcattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 1920

gatcggctcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 1980

gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 2040

agcgcgcta atacgacta ctatagggcg aattgggtac cgggcccccc ctgaggtcg 2100

acggcgccc actggtagag agcgactttg tatgcccacaa ttgcgaaacc cgcgatatcc 2160

ttctcgatc tttagtacc gaccaggaca aggaaaagga ggtcgaaacg tttttgaaga 2220

aacaagagga actacacgga agctctaaag atggcaacca gccagaaact aagaaaatga 2280
agttgatgga tccaactggc accgctggct tgaacaacaa taccagcctt ccaacttctg 2340
taaataacgg cggtacgcca gtgccaccag taccgttacc tttcgggtata cctcctttcc 2400
ccatgtttcc aatgcccttc atgcctccaa cggctactat cacaaatcct catcaagctg 2460
acgcaagccc taagaaatga ataacaatac tgacagtact aaataattgc ctacttggct 2520
tcacatacgt tgcatacgtc gatatagata ataatagataa tgacagcagg attatcgtaa 2580
tacgtaatatg ttgaaaatct caaaaatgtg tgggtcatta cgtaaataat gataggaatg 2640

ggattcttct atttttcctt tttccattct agcagccgctc gggaaaacgt ggcacccctct 2700
ctttcgggct caattggagt cacgctgccg tgagcacctt ctttttccat atctaacaac 2760
tgagcacgta accaatggaa aagcatgagc ttagcggtgc tccaaaaaag tattggatgg 2820
ttaataccat ttgtctgttc tcttctgact ttgactcctc aaaaaaaaaa aatctacaat 2880
caacagatcg cttaattac gccctcacia aaactttttt ctttcttctt cgcccacgtt 2940
aaattttatc cctcatgttg tctaacggat tctgcactt gatttattat aaaaagacaa 3000
agacataata cttctctatc aatttcagtt attgttcttc cttgcgttat tcttctgttc 3060

ttctttttct ttgtcatat ataaccataa ccaagtaata catattcaaa ctagtatgac 3120
tgacaaaaaa actcttaaag acttaagaaa tcgtagtctt gtttacgatt caatggttaa 3180
atcacctaata cgtgctatgt tgcgtgcaac tggatatcaa gatgaagact ttgaaaaacc 3240
tatcgtcggg gtcatattcaa cttgggctga aaacacacct tgtaatatcc acttacatga 3300
cttttggtaaa ctagccaaag tcgggtgttaa ggaagctggg gcttggccag ttcagttcgg 3360
aacaatcacg gtttctgatg gaatcgccat gggaacccaa ggaatgcgtt tctccttgac 3420
atctcgtgat attattgcag attctattga agcagccatg ggaggtcata atgcggatgc 3480

ttttgtagcc attggcggtt gtgataaaaa catgcccggt tctgttatcg ctatggctaa 3540
catggatata ccagccattt ttgcttacgg cggaacaatt gcacctggta atttagacgg 3600
caaagatata gatttagctt ctgtctttga aggtgtcggc cattggaacc acggcgatat 3660
gaccaaagaa gaagttaaag ctttggaatg taatgcttgt cccggtcctg gaggtgcgg 3720
tggtatgtat actgctaaca caatggcgac agctattgaa gttttgggac ttagccttcc 3780
gggttcatct tctcaccggc ctgaatccgc agaaaagaaa gcagatatg aagaagctgg 3840
tcgcgtgtt gtcaaaatgc tcgaaatggg cttaaaacct tctgacattt taacgcgtga 3900

agcttttgaa gatgctatta ctgtaactat ggctctggga ggttcaacca actcaaccct 3960
tcacctctta gctattgccc atgctgctaa tgtggaattg aacttgatg atttcaatac 4020
ttccaagaa aaagtctctc atttggctga ttgaaacct tctggatcaat atgtattcca 4080

agacctttac aaggctcgag gggtagcagc agttatgaaa tatctcctta aaaatggctt 4140
 ccttcatggt gaccgtatca cttgtactgg caaaacagtc gctgaaaatt tgaaggcttt 4200
 tgatgattta acacctgggc aaaaggttat tatgccgctt gaaaaatccta aacgtgaaga 4260
 tggctcgcctc attattctcc atggtaactt ggctccagac ggtgccgttg ccaaagtttc 4320

 tgggtgaaaa gtgcgtcgtc atgtcgggtc tgctaaggtc ttttaattctg aagaagaagc 4380
 cattgaagct gtcttgaatg atgatattgt tgatgggtgat gttgttgtcg tacgttttgt 4440
 aggaccaaag ggcggctcctg gtatgcctga aatgctttcc ctttcatcaa tgattgttgg 4500
 taaagggcaa ggtgaaaaag ttgcccttct gacagatggc cgcttctcag gtggtactta 4560
 tggctctgtc gtgggtcata tcgtcctga agcacaagat ggcggtccaa tcgcctacct 4620
 gcaaacagga gacatagtca ctattgacca agacactaag gaattacact ttgatatctc 4680
 cgatgaagag ttaaaacatc gtcaagagac cattgaattg ccaccgtctc attcacgcgg 4740

 tatccttggg aaatatgctc acatcgtttc gtctgcttct aggggagccg taacagactt 4800
 ttggaagcct gaagaaactg gcaaaaaatg ttgtcctggg tgctgtggtt aagcgccgc 4860
 gtaattcaa attaatgat atagtttttt aatgagtatt gaatctgttt agaaataatg 4920
 gaatatattt tttatttatt tatttatatt attggctggc tctttcttc tgaaggtaa 4980
 tgacaaaatg atatgaagga aataatgatt tctaaaattt tacaacgtaa gatattttta 5040
 caaaagccta gtcacatctt tgtcatgcac tattttactc acgcttgaaa ttaacggcca 5100
 gtccactgcg gagtcatctc aaagtcaccc taatcgatct atcgtttttg atagtcatt 5160

 ttggagtctg cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aatttttatt tcattctgga 5220
 actcttcgag ttctttgtaa agtctttcat agtagcttac tttatcctcc aacatattta 5280
 acttcatgtc aatttcggt cttaaatctt ccacatcacc aagttcaaca tcacttttta 5340
 acttgaattt attctctagc tcttccaacc aagcctcatt gctccttgat ttactggtga 5400
 aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaactttc ctgcaaagaa ttcaccaatt 5460
 tctcgacatc atagtacaat ttgttttgtt ctcccatcac aatttaatat acctgatgga 5520
 ttcttatgaa gcgctgggta atggacgtgt cactctactt cgccttttc cctactcctt 5580

 ttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtaataa taatattatt aatcggcaaa 5640
 aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcgtacca tcttgaatg 5700
 ctcccaatt gtatattaa agtcatcaca gcaacatatt cttgttatta aattaattat 5760
 tattgatttt tgatattgta taaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagt aataaaaaat 5820
 accaagtatg gagaatatata ttagaagtct atacgttaaa ccaccgcgtt ggagctccag 5880
 cttttgttcc ctttagtgag ggttaattgc gcgcttggcg taatcatggt catagctgtt 5940

| | |
|--|------|
| tcctgtgtga aattgttata cgctcacaat tccacacaac ataggagccg gaagcataaa | 6000 |
| | |
| gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag gtaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact | 6060 |
| gcccgttttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc | 6120 |
| ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg | 6180 |
| ctcggctggt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc | 6240 |
| cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag | 6300 |
| gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca | 6360 |
| tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca | 6420 |
| | |
| ggcgtttccc cciggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg | 6480 |
| atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag | 6540 |
| gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt | 6600 |
| tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca | 6660 |
| cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg | 6720 |
| cgggtgtaca gagtcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt | 6780 |
| tggtatctgc gctctgtga agccagttac ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc | 6840 |
| | |
| cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg | 6900 |
| cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatctttct acggggctctg acgctcagtg | 6960 |
| gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgtt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta | 7020 |
| gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg | 7080 |
| gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggacacctatc tcagcgatct gtctatttcg | 7140 |
| ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc | 7200 |
| atctggcccc agtgcgtcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttata | 7260 |
| | |
| agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc | 7320 |
| ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag | 7380 |
| tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat | 7440 |
| ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg | 7500 |
| caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt | 7560 |
| gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag | 7620 |
| atgcttttct gtgactgggt agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg | 7680 |

| | |
|---|------|
| accgagtgtc tcttgcccg gctcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt | 7740 |
| aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct | 7800 |
| gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac | 7860 |
| tttaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat | 7920 |
| aaggcgaca cgaaatgtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat | 7980 |
| ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catattgaa tgtatttaga aaaataaaca | 8040 |
| aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct gaacgaagca tctgtgcttc | 8100 |
| | |
| atttttaga acaaaaatgc aacgcgagag cgctaatttt tcaaacaag aatctgagct | 8160 |
| gcatttttac agaacagaaa tgcaacgcga aagcgctatt ttaccaacga agaattctgtg | 8220 |
| cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc gagagcgcta atttttcaa caaagaatct | 8280 |
| gagctgcatt ttacagaac agaaatgcaa cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat | 8340 |
| ctatacttct tttttgtct acaaaaatgc atcccagag cgctattttt ctaacaaagc | 8400 |
| atcttagatt acttttttc tctttgtgc gctctataat gcagtccttt gataactttt | 8460 |
| tgcaactgtg gtccgttaag gttagaagaa ggctactttg gtgtctattt tctcttccat | 8520 |
| | |
| aaaaaaagcc tgactccact tcccgcgttt actgattact agcgaagctg cgggtgcatt | 8580 |
| ttttcaagat aaaggcatcc ccgattatat tctataccga tgtggattgc gcatactttg | 8640 |
| tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct tcattgggtca gaaaattatg aacggtttct | 8700 |
| tctattttgt ctctatatac tacgtatagg aaatgtttac attttcgtat tgttttcgat | 8760 |
| tcactctatg aatagtcttt actacaattt ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa | 8820 |
| cataaaaaat gtagaggtcg agtttagatg caagttcaag gagcgaaagg tggatgggta | 8880 |
| ggttatatag ggatatagca cagagatata tagcaaagag atacttttga gcaatgtttg | 8940 |
| | |
| tggaagcgggt attcgcaata ttttagtagc tcgttacagt ccggtgcgtt tttggttttt | 9000 |
| tgaaagtgcg tcttcagagc gcttttgggt ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt | 9060 |
| ctagagaata ggaacttcgg aataggaact tcaaagcgtt tccgaaaacg agcgcttccg | 9120 |
| aaaatgcaac gcgagctgcg cacatacagc tcactgttca cgtcgacct atatctgcgt | 9180 |
| gttgccctgta tatatatata catgagaaga acggcatagt gcgtgtttat gcttaaatgc | 9240 |
| gtacttatat gcgtctattt atgtaggatg aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta | 9300 |
| tccatttcca tgcgggggtat cgtaigcttc cttcagcact acccttttagc tgttctatat | 9360 |
| | |
| gctgccactc ctcaattgga ttagtctcat ccttcaatgc tatcatttcc tttgatattg | 9420 |
| gatcatctaa gaaaccattt ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag | 9480 |
| gccctttcgt c | 9491 |

<210> 69

<211> 1000

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 69

| | |
|---|------|
| gttaattcaa attaattgat atagtttttt aatgagtatt gaatctgttt agaaataatg | 60 |
| gaatattatt ttiatttatt tatttatatt attggtcggc tcttttcttc tgaaggtaa | 120 |
| tgacaaaatg atatgaagga aataatgatt tctaaaattt tacaacgtaa gatattttta | 180 |
| | |
| caaaagccta gtcacatctt tgtcatgcac tattttactc acgcttgaaa ttaacggcca | 240 |
| gtccactgcg gaggcatttc aaagtcaccc taatcgatct atcgtttttg atagtcatt | 300 |
| ttggagttcg cgattgtctt ctgttattca caactgtttt aatttttatt tcattctgga | 360 |
| actcttcgag ttctttgtaa agtctttcat agtagcttac tttatcctcc aacatattta | 420 |
| acttcatgtc aatttcggct cttaaatttt ccacatcacc aagttcaaca tcattcttta | 480 |
| acttgaattt attctctage tcttccaacc aagcctcatt gctccttgat ttactgggta | 540 |
| aaagtgatac actttgcgcg caatccaggt caaaactttc ctgcaaagaa ttcaccaatt | 600 |
| | |
| tctcgacatc atagtacaat ttgttttggt ctcccatcac aatttaatat acctgatgga | 660 |
| ttcttatgaa gcgctgggta atggacgtgt cactctactt cgcctttttc cctactcctt | 720 |
| ttagtacgga agacaatgct aataaataag agggtataaa taatattatt aatcggcaaa | 780 |
| aaagattaaa cgccaagcgt ttaattatca gaaagcaaac gtcgtaccaa tccttgaatg | 840 |
| cttccaatt gtatattaag agtcacacac gcaacatatt cttgttatta aattaattat | 900 |
| tattgatttt tgatattgta taaaaaacc aaatatgtat aaaaaaagtg aataaaaaat | 960 |
| accaagtatg gagaaatata ttagaagtct atacgttaaa | 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 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
 545 550 555 560
 Glu Gly Glu Tyr Pro Gln Phe Gly Asn Asn Asp Pro Arg Val Asp Asp

 565 570 575
 Leu Ala Val Asp Leu Val Glu Arg Phe Met Lys Lys Ile Gln Lys Leu
 580 585 590
 His Thr Tyr Arg Asp Ala Ile Pro Thr Gln Ser Val Leu Thr Ile Thr
 595 600 605
 Ser Asn Val Val Tyr Gly Lys Lys Thr Gly Asn Thr Pro Asp Gly Arg
 610 615 620
 Arg Ala Gly Ala Pro Phe Gly Pro Gly Ala Asn Pro Met His Gly Arg

 625 630 635 640
 Asp Gln Lys Gly Ala Val Ala Ser Leu Thr Ser Val Ala Lys Leu Pro
 645 650 655
 Phe Ala Tyr Ala Lys Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Phe Ser Ile Val Pro
 660 665 670
 Asn Ala Leu Gly Lys Asp Asp Glu Val Arg Lys Thr Asn Leu Ala Gly
 675 680 685
 Leu Met Asp Gly Tyr Phe His His Glu Ala Ser Ile Glu Gly Gly Gln

 690 695 700
 His Leu Asn Val Asn Val Met Asn Arg Glu Met Leu Leu Asp Ala Met
 705 710 715 720
 Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr Ile Arg Val Ser Gly Tyr
 725 730 735
 Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Lys Glu Gln Gln Gln Asp Val Ile
 740 745 750
 Thr Arg Thr Phe Thr Gln Ser Met
 755 760

<210> 71

<211> 2283

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 71

| | |
|---|------|
| atgtccgagc ttaatgaaaa gttagccaca gcctgggaag gttttaccaa aggtgactgg | 60 |
| cagaatgaag taaacgtccg tgacttcatt cagaaaaact acactccgta cgagggtgac | 120 |
| gagtccttcc tggctggcgc tactgaagcg accaccaccc tgtgggacaa agtaatggaa | 180 |
| ggcgttaaac tggaaaaccg cactcacgcg ccagttgact ttgacaccgc tgttgcttcc | 240 |
| accatcacct ctcacgacgc tggctacatc aacaagcagc ttgagaaaaat cgttggtctg | 300 |
| cagactgaag ctccgctgaa acgtgctctt atcccgttcg gtggtatcaa aatgatcgaa | 360 |
| | |
| ggttcctgca aagcgtacaa ccgcgaactg gatccgatga tcaaaaaaat cttcactgaa | 420 |
| taccgtaaaa ctcacacca gggcgtgttc gacgtttaca ctccggacat cctgcgttgc | 480 |
| cgtaaatctg gtgttctgac cggcttgcca gatgcatatg gccgtggccg tatcatcggt | 540 |
| gactaccgtc gcgttgcgct gtacggtatc gactacctga tgaaagacaa actggcacag | 600 |
| ttcacttctc tgcaggctga tctggaaaac ggcgtaaaacc tggaaacagac tatccgtctg | 660 |
| cgcaagaaa tcgtgaaca gcaccgcgct ctgggtcaga tgaaagaaat ggctgcgaaa | 720 |
| tacggctacg acatctctgg tccggtacc aacgctcagg aagctatcca gtggacttac | 780 |
| | |
| ttcggctacc tggctgctgt taagtctcag aacggtgctg caatgtcctt cggctcgtacc | 840 |
| tccaccttcc tggatgtgta catcgaacgt gacctgaaag ctggcaagat caccgaacaa | 900 |
| gaagcgcagg aaatggttga ccacctggtc atgaaactgc gtatggttcg ctctctgcgt | 960 |
| actccggaat acgatgaact gttctctggc gacccgatct gggcaaccga atctatcggt | 1020 |
| ggtatgggcc tcgacggtcg taccctggtt accaaaaaca gcttccgttt cctgaacacc | 1080 |
| ctgtacacca tgggtccgtc tccggaaccg aacatgacca ttctgtggtc tgaaaaactg | 1140 |
| ccgctgaact tcaagaaatt cgccgctaaa gtgtccatcg acacctcttc tctgcagtat | 1200 |
| | |
| gagaacgatg acctgatgcg tccggacttc aacaacgatg actacgtat tgcttgctgc | 1260 |
| gtaagccga tgatcgttgg taaacaaatg cagttcttcg gtgcgcgtgc aaacctggcg | 1320 |
| aaaaccatgc tgiacgcaat caacggcggc gttgacgaaa aactgaaaat gcaggttggt | 1380 |
| ccgaagtctg aaccgatcaa aggcgatgtc ctgaactatg atgaagtgat ggagcgcgatg | 1440 |
| gatcacttca tggactggct ggctaaacag tacatcactg cactgaacat catccactac | 1500 |
| atgcacgaca agtacagcta cgaagcctct ctgatggcgc tgcacgaccg tgacgttatc | 1560 |
| cgcacatagg cgtgtggtat cgctggtctg tccgttgctg ctgactccct gtctgcaatc | 1620 |
| | |
| aaatatgcga aagttaaac gattcgtgac gaagacggtc tggctatcga cttcgaaatc | 1680 |

gaaggcgaat accgcagtt tggtaacaat gatccgctg tagatgacct ggctgttgac 1740
ctggtagaac gtttcatgaa gaaaattcag aaactgcaca cctaccgtga cgctatcccg 1800
actcagtctg ttctgacat cacttctaac gttgtgtatg gtaagaaaac gggtaacacc 1860
ccagacggtc gtcgtgctgg cgcgccgttc ggaccgggtg ctaaccgat gcacggtcgt 1920
gaccagaaag gtgcagtagc ctctctgact tccgttgcta aactgccgtt tgcttacgt 1980
aaagatggta tctcctacac cttctctatc gttccgaacg cactgggtaa agacgacgaa 2040

gttcgtaaga ccaacctggc tggctctgat gatggttact tccaccacga agcatccatc 2100
gaaggtggtc agcacctgaa cgtaaacgtg atgaaccgtg aatgctgct cgacgcgatg 2160
gaaaacccgg aaaaatatcc gcagctgacc atccgtgtat ctggctacgc agtacgtttc 2220
aactcgtga ctaaagaaca gcagcaggac gttattactc gtaccttcac 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 Asp Asn Leu
35 40 45
Ala Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Trp Ser Cys Arg Met Ala Ile Cys Gly
50 55 60
Ser Cys Gly Met Met Val Asn Asn Val Pro Lys Leu Ala Cys Lys Thr

65 70 75 80
Phe Leu Arg Asp Tyr Thr Asp Gly Met Lys Val Glu Ala Leu Ala Asn
85 90 95
Phe Pro Ile Glu Arg Asp Leu Val Val Asp Met Thr His Phe Ile Glu
100 105 110
Ser Leu Glu Ala Ile Lys Pro Tyr Ile Ile Gly Asn Ser Arg Thr Ala
115 120 125

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 | |
| Gln Phe Ser Gly Cys Ile Asn Cys Gly Leu Cys Tyr Ala Ala Cys Pro | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gln Phe Gly Leu Asn Pro Glu Phe Ile Gly Pro Ala Ala Ile Thr Leu | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Ala His Arg Tyr Asn Glu Asp Ser Arg Asp His Gly Lys Lys Glu Arg | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Met Ala Gln Leu Asn Ser Gln Asn Gly Val Trp Ser Cys Thr Phe Val | | | |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 | |
| Gly Tyr Cys Ser Glu Val Cys Pro Lys His Val Asp Pro Ala Ala Ala | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Ile Gln Gln Gly Lys Val Glu Ser Ser Lys Asp Phe Leu Ile Ala Thr | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Leu Lys Pro Arg | | | |

<210> 73

<211> 735

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 73

| | |
|---|-----|
| atggctgaga tgaaaaacct gaaaattgag gtggtgcgct ataaccgga agtcgatacc | 60 |
| | |
| gcaccgcata gcgcattcta tgaagtgcct tatgacgcaa ctacctcatt actggatgcg | 120 |
| ctgggctaca tcaaagacaa cctggcaccg gacctgagct accgctggtc ctgccgtatg | 180 |
| gcgatttgtg gttcctgcgg catgatggtt aacaacgtgc caaaactggc atgtaaaacc | 240 |
| ttcctgcgtg attacaccga cggtatgaag gttgaagcgt tagctaactt cccgattgaa | 300 |
| cgcatctgg tggtcgatat gaccacttc atcgaaagtc tggaagcgat caaacgtac | 360 |
| atcatcgga actccgcac cgcgatcag ggtactaaca tccagacccc ggcgcatg | 420 |
| gcgaagtatc accagttctc cggttgcatc aactgtggtt tgtgctacgc cgcgtgcccg | 480 |
| | |
| cagtttggcc tgaaccaga gttcatcggt ccggctgcca ttacgtggc gcatcgttat | 540 |
| aacgaagata gccgcgacca cggtagaag gagcgtatgg cgcagttgaa cagccagaac | 600 |

ggcgtatgga gctgtacttt cgtgggctac tgctccgaag tctgcccgaac acacgtcgat 660
 ccggctgcgg ccattcagca gggcaaagta gaaagtcca 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 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 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 Arg Tyr Ala Glu Ile Ala Asp His Leu Gly Leu

770 775 780

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

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

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

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

835 840 845

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

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

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

<210> 75

<211> 2676

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 75

atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtaaa aaaagcccag 60

cgatgaatatg ccagtttcac tcaagagcaa gtagacaaaa tcttcgcgcg cgccgctctg 120

gctgctgcag atgctcgaat cccactcgcg aaaatggccg ttgccgaatc cggcatgggt 180

atcgtcgaag ataaagtgat caaaaaccac ttgtctctg aatatatcta caacgcctat 240

aaagatgaaa aaacctgtgg tgttctgtct gaagacgaca cttttgttac catcactatc 300

gctgaaccaa tcggtattat ttgcggtatc gttccgacca ctaacccgac ttcaactgct 360

atcttcaaat cgctgatcag tctgaagacc cgtaacgcca ttatcttctc cccgcacccg 420

cgtgcaaaag atgccaccaa caaagcggct gatatcgttc tgcaggctgc tatcgtgcc 480

ggtgctccga aagatctgat cggctggatc gatcaacctt ctgttgaact gtctaacgca 540

ctgatgcacc acccagacat caacctgatc ctgcgcactg gtggtccggg catggttaaa 600

gccgcataca gctccggtaa accagctatc ggtgtaggcg cgggcaacac tccagtgttt 660

atcgaatgaaa ctgctgatat caaacgtgca gttgcatctg tactgatgtc caaaaccttc 720

gacaacggcg taatctgtgc ttctgaacag tctgttgttg ttgttgactc tgtttatgac 780

gctgtacgtg aacgttttgc aaccacggc ggctatctgt tgcagggtaa agagctgaaa 840

gctgttcagg atgttatcct gaaaaacggt gcgctgaacg cggctatcgt tggtcagcca 900

gcctataaaa ttgctgaact ggcaggcttc tctgtaccag aaaacaccaa gattctgatc 960

ggtgaagtga ccgttgttga tgaaagcgaa ccgttcgcac atgaaaaact gtccccgact 1020

ctggcaatgt accgcgctaa agatttcgaa gacgcggtag aaaaagcaga gaaactggtt 1080

gctatggcg gtatcggtca tactcttgc ctgtacactg accaggataa ccaaccggct 1140

cgcgtttctt acttcggtca gaaaatgaaa acggcgcgta tccgtattaa caccacgagc 1200

tctcagggtg gtatcggtga cctgtataac ttcaaactcg caccttcctt gactctgggt 1260

tgtggttctt ggggtggtaa ctccatctct gaaaacgttg gtccgaaaca cctgatcaac 1320

aagaaaaccg ttgctaagcg agctgaaaac atgttgtggc acaaacttcc gaaatctatc 1380

tacttcgcc gtggctccct gccaatcgcg ctggatgaag tgattactga tggccacaaa 1440

cgtgcgctca tcgtgactga ccgcttctg ttcaacaatg gttatgctga tcagatcact 1500

tccgtactga aagcagcagg cgttgaaact gaagtcttct tcgaagtaga agcggacccg 1560

acctgagca tcgttcgtaa aggtgcagaa ctggcaaact ccttcaaacc agacgtgatt 1620

atcgcgctgg gtggtggttc cccgatggac gccgcgaaga tcatgtgggt tatgtacgaa 1680

catccggaat ctcacttcga agagctggcg ctgcgcttta tggatatccg taaacgtatc 1740

tacaagttcc cgaaaatggg cgtgaaagcg aaaatgatcg ctgtcaccac cacttctggt 1800
acaggttctg aagtcactcc gtttgcggtt gtaactgacg acgctactgg tcagaaatat 1860
ccgctggcag actatgcgct gactccggat atggcgattg tcgacgcaa cctggttatg 1920
gacatgccga agtcctgtg tgctttcggg ggctggacg cagtaactca cgccatggaa 1980
gcttatgttt ctgtactggc atctgagttc tctgatggtc aggcctctga ggcactgaaa 2040
ctgctgaaag aatatctgcc agcgtcctac cacgaagggt ctaaaaatcc ggtagcgcgt 2100
gaacgtgttc acagtgcagc gactatcgcg ggatcgcgt ttgcgaacgc cttcctgggt 2160

gtatgtcact caatggcgca caaactgggt tcccagttcc atattccgca cggctctggca 2220
aacgccctgc tgattttgaa cgttattcgc tacaatgcga acgacaacc gaccaagcag 2280
actgcattca gccagtatga ccgtccgcag gctcgccgtc gttatgctga aattgccgac 2340
cacttgggtc tgagcgcacc gggcgaccgt actgctgcta agatcgagaa actgctggca 2400
tggttgaaa cgctgaaagc tgaactgggt attccgaaat ctatccgtga agctggcgtt 2460
caggaagcag acttcctggc gaacgtggat aaactgtctg aagatgcatt cgatgaccag 2520
tgcaccggcg ctaaccgcg ttaccgcgtg atctccgagc tgaaacagat tctgctggat 2580

acctactacg gtcgtgatta tgtagaaggt gaaactgcag cgaagaaaga agctgctccg 2640
gctaaagctg agaaaaaagc gaaaaaatcc 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 Lys Tyr Leu

1 5 10 15

Gln Gln Val Asn Glu Ser Phe Gly Phe Glu Leu Glu Phe Phe Asp Phe

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ile Phe Val Asn Asp Asp Gly Ser Arg Pro Val Leu Glu Glu Leu

50 55 60

Lys Lys His Gly Val Lys Tyr Ile Ala Leu Arg Cys Ala Gly Phe Asn

65 70 75 80

Asn Val Asp Leu Asp Ala Ala Lys Glu Leu Gly Leu Lys Val Val Arg

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

<210> 77

<211> 990

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 77

| | |
|--|-----|
| atgaaactcg ccgtttatag cacaaaacag tacgacaaga agtacctgca acaggtgaac | 60 |
| gagtcctttg gccttgagct ggaatTTTT gactttctgc tgacggaaaa aaccgctaaa | 120 |
| actgccaatg gctgcgaagc ggtatgtatt ttcgtaaagc atgacggcag ccgcccgggtg | 180 |
| | |
| ctggaagagc tgaaaaagca cggcgttaaa tatatcgccc tgcgctgtgc cggtttcaat | 240 |
| aacgtcgacc ttgacgcggc aaaagaactg gggctgaaag tagtccgtgt tccagcctat | 300 |
| gatccagagg ccgttgctga acacccatc ggtatgatga tgacgtgaa ccgcccgtatt | 360 |
| caccgcgcgt atcagcgtac ccgtgatgct aacttctctc tggaaggtct gaccggcttt | 420 |
| actatgtatg gcaaacggc aggcgttata ggtaccggtg aaatcggtgt ggcgatgctg | 480 |
| cgcattctga aaggttttgg tatgcgtctg ctggcgttcg atccgtatcc aagtgcagcg | 540 |
| gcgctggaac tcggtgtgga gtatgtcgat ctgccaaccc tgttctctga atcagacgtt | 600 |
| | |
| atctctctgc actgcccgt gacaccggaa aactatcatc tgttgaacga agccgccttc | 660 |
| gaacagatga aaaaaggcgt gatgatctc aataccagtc gcggtgcatt gattgattct | 720 |
| caggcagcaa ttgaagcgt gaaaaatcag aaaattggtt cgttgggtat ggacgtgtat | 780 |
| gagaacgaac gcgatctatt ctttgaagat aaatccaacg acgtgatcca ggatgacgta | 840 |
| ttccgtcgcc tgctgcctg ccacaacgtg ctgtttaccg ggcaccaggc attcctgaca | 900 |
| gcagaagctc tgaccagtat ttctcagact acgtgcaaa acttaagcaa tctggaaaaa | 960 |
| ggcgaaacct gcccgaaacga actggtttaa | 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
 cgagtctgtt ttggcagtc 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 ctggtttatc 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 ggatccccgg gtacc

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 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

225 230 235 240
Gly Ile Leu Met Thr Glu Gly Cys Arg Gly Glu Gly Gly Ile Leu Val

245 250 255
Asn Lys Asn Gly Tyr Arg Tyr Leu Gln Asp Tyr Gly Met Gly Pro Glu

260 265 270
Thr Pro Leu Gly Glu Pro Lys Asn Lys Tyr Met Glu Leu Gly Pro Arg

275 280 285
Asp Lys Val Ser Gln Ala Phe Trp His Glu Trp Arg Lys Gly Asn Thr

290 295 300
Ile Ser Thr Pro Arg Gly Asp Val Val Tyr Leu Asp Leu Arg His Leu

305 310 315 320
Gly Glu Lys Lys Leu His Glu Arg Leu Pro Phe Ile Cys Glu Leu Ala

325 330 335
Lys Ala Tyr Val Gly Val Asp Pro Val Lys Glu Pro Ile Pro Val Arg

340 345 350
Pro Thr Ala His Tyr Thr Met Gly Gly Ile Glu Thr Asp Gln Asn Cys

355 360 365
Glu Thr Arg Ile Lys Gly Leu Phe Ala Val Gly Glu Cys Ser Ser Val

370 375 380
Gly Leu His Gly Ala Asn Arg Leu Gly Ser Asn Ser Leu Ala Glu Leu

385 390 395 400
Val Val Phe Gly Arg Leu Ala Gly Glu Gln Ala Thr Glu Arg Ala Ala

405 410 415

Thr Ala Gly Asn Gly Asn Glu Ala Ala Ile Glu Ala Gln Ala Ala Gly

420 425 430

Val Glu Gln Arg Leu Lys Asp Leu Val Asn Gln Asp Gly Gly Glu Asn

435 440 445

Trp Ala Lys Ile Arg Asp Glu Met Gly Leu Ala Met Glu Glu Gly Cys

450 455 460

Gly Ile Tyr Arg Thr Pro Glu Leu Met Gln Lys Thr Ile Asp Lys Leu

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 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 tcttgccatt gtaggcgccg gtggcgcgagg attacgtgct 60

gcaattgctg ccgcgcaggc aaatccgaat gcaaaaatcg cactaatctc aaaagtatac 120

ccgatgcgta gccataccgt tgctgcagaa gggggctccg ccgctgtcgc gcaggatcat 180
gacagcttcg aatatcactt tcacgataca gtagcgggtg gcgactggtt gtgtgagcag 240
gatgtcgtgg attatttcgt ccaccactgc ccaaccgaaa tgacccaact ggaactgtgg 300
ggatgcccac ggagccgtcg cccggatggt agcgtcaacg tacgtcgtt cggcggcatg 360
aaaatcgagc gcacctgggt cgccgccgat aagaccggct tccatatgct gcacacgtg 420
ttccagacct ctctgcaatt cccgcagatc cagcgttttg acgaacattt cgtgctggat 480
attctggttg atgatggta tggtcgcggc ctggtagcaa tgaacatgat ggaaggcacg 540

ctggtgcaga tccgtgctaa cgcggtcgtt atggctactg gcggtgcggg tcgcgtttat 600
cgttacaaca ccaacggcgg catcgttacc ggtgacggta tgggtatggc gctaagccac 660
ggcgttccgc tgctgacat ggaattcgtt cagtatcacc caaccggtct gccaggttcc 720
ggtatcctga tgaccgaagg ttgcccggt gaaggcggta ttctggtcaa caaaatggc 780
taccgttacc tgcaagatta cggcatgggc ccgaaactc cgctgggcga gccgaaaaac 840
aaatatatgg aactgggtcc acgcgacaaa gtctctcagg cttcttgga cgaatggcgt 900
aaaggcaaca ccatctccac gccgcgtggc gatgtggttt atctcgactt gcgtcacctc 960

ggcgagaaaa aactgcatga acgtctgccg ttcactctgcg aactggcgaa agcgtacgtt 1020
ggcgtcgatc cggttaaaga accgattccg gtacgtccga ccgcacacta caccatgggc 1080
ggtatcgaaa ccgatcagaa ctgtgaaacc cgcattaaag gtctgttcgc cgtgggtgaa 1140
tgttctctg ttggtctgca cgggtgcaaac cgtctgggtt ctaactccct gccggaactg 1200
gtggtcttcg gccgtctggc cggtaacaa gcgacagagc gtgcagcaac tgccggtaat 1260
ggcaacgaag cggcaattga agcgcaggca gctggcgttg aacaacgtct gaaagatctg 1320
gttaaccagg atggcggcga aaactgggcg aagatccgcg acgaaatggg cctggctatg 1380

gaagaaggct gcggtatcta ccgtacgccg gaactgatgc agaaaacat cgacaagctg 1440
gcagagctgc aggaacgctt caagcgcgtg cgcataccg acacttcag cgtgttcaac 1500
accgacctgc tctacacat tgaactgggc caggtctga acgttctga atgtatggc 1560
cactccgcaa tggcacgtaa agagtccgc gccgcgcacc agcgtctgga cgaaggttg 1620
accgagcgtg acgacgtcaa ctctctcaa cacacctcg cttccgcga tgctgatggc 1680
acgactgcc tggagtacg gcagctgaag attactacg tgccgccagc taaacgcgtt 1740
tacgtggcg aagcggatgc agccgataag gcggaagcag ccaataagaa ggagaaggcg 1800

aatggctga 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 gtatgtacgg ccaatgacgt ccacctggtg gaaaaaattg 60

ccgttttatt gctttttacat gctgcgcgaa ggcacggcgg ttccggctgt gtggttcagc 120

attgaactga ttttcgggct gtttgccctg aaaaatggcc cggaagcctg ggcgggattc 180

gtcgactttt tacaaaaccc ggttatcgtg atcattaacc tgatcactct ggcggcagct 240

ctgctgcaca ccaaaacctg gtttgaactg gcaccgaaag cggccaatat cattgtaaaa 300

gacgaaaaaa tgggaccaga gccattatc aaaagtctct gggcggtaac tgtggttgcc 360

accatcgtaa tcctgtttgt 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 gaaccggtat tctggggcct cticggggcc 60

ggtgggatgt ggagcgccat cattgcgccg gtgatgatcc tgctgggtggg tattctgctg 120

ccactgggggt tgtttccggg tgatgcgctg agctacgagc gcgttctggc gttcgcgcag 180

agcttcattg gtcgcgtatt cctgttctctg atgatcgttc tgccgctgtg gtgtggttta 240

caccgatgc accacgcgat gcacgatctg aaaatccacg tacctgcggg caaatggggtt 300

ttctacggtc tggctgctat cctgacagtt gtcacgctga ttggtgtcgt tacaatctaa 360