



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112771069 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 11

(21) 申请号 201980051927.9	CNCM I-5266 2017.12.20
(22) 申请日 2019.07.02	(73) 专利权人 乐斯福公司
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112771069 A	地址 法国巴黎
(43) 申请公布日 2021.05.07	(72) 发明人 G·皮涅德 M·佩蒂 B·托马斯 S·于兰
(30) 优先权数据 1856080 2018.07.02 FR	(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256 专利代理师 孟凡宏
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.02.03	(51) Int.Cl. C07K 14/395 (2006.01) C12N 1/18 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2019/067668 2019.07.02	(56) 对比文件 US 2013/0323822 A1, 2013.12.05 WO 2018007154 A1, 2018.01.11 US 2006/0270006 A1, 2006.11.30 审查员 冷千里
(87) PCT国际申请的公布数据 WO2020/007823 FR 2020.01.09	权利要求书2页 说明书19页 序列表28页 附图3页
(83) 生物保藏信息 CNCM I-5265 2017.12.20 CNCM I-4997 2015.07.09 CNCM I-4071 2008.09.04 CNCM I-5264 2017.12.20 CNCM I-5201 2017.04.26 CNCM I-4829 2013.12.12	

(54) 发明名称

表达外源葡糖淀粉酶和木聚糖酶的酿酒酵母菌株及其在生产生物乙醇中的用途

(57) 摘要

本发明涉及了基因改造的酿酒酵母菌株,以共表达编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因,编码酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因以及编码真菌来源的木聚糖酶的基因。这些菌株的生物乙醇产率高于其他相同的、但不包含编码真菌来源的木聚糖酶的基因的菌株。本发明还涉及获得这些菌株的方法及这些菌株在生产生物乙醇中的用途。

1. 酿酒酵母菌株,其特征在于,其共表达:
 - 编码黑曲霉木聚糖酶的基因,其中所述黑曲霉木聚糖酶由核酸序列SEQ ID NO:5编码;
 - 编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因,其中所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:1编码;和
 - 编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因,其中所述酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:3编码,并且,其中所述酿酒酵母菌株包含:
 - 1个拷贝或4个拷贝的所述编码黑曲霉木聚糖酶的基因;
 - 6个拷贝的所述编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因;和
 - 4个拷贝的所述编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因。
2. 如权利要求1所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述黑曲霉木聚糖酶由多肽序列SEQ ID NO:6组成。
3. 如权利要求1所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶由多肽序列SEQ ID NO:4组成。
4. 如权利要求2所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶由多肽序列SEQ ID NO:4组成。
5. 如权利要求1所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由多肽序列SEQ ID NO:2组成。
6. 如权利要求2所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由多肽序列SEQ ID NO:2组成。
7. 如权利要求3所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由多肽序列SEQ ID NO:2组成。
8. 如权利要求4所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由多肽序列SEQ ID NO:2组成。
9. 如权利要求1-8任一项所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,所述编码黑曲霉木聚糖酶的基因、所述编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因以及所述编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因被整合至所述酵母菌株的基因组中。
10. 如权利要求1所述的酿酒酵母菌株,其特征在于,其是于2017年4月26日以保藏号I-5201保藏于CNCM的菌株。
11. 获得可用于生产生物乙醇的酿酒酵母菌株的方法,所述方法包括如下步骤:
 - (a) 基因改造酿酒酵母,使其共表达:
 - 编码黑曲霉木聚糖酶的基因,其中所述黑曲霉木聚糖酶由核酸序列SEQ ID NO:5编码;
 - 编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因,其中所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:1编码;和
 - 编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因,其中所述酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:3编码,使得所述基因改造的酿酒酵母菌株包含:

-1个拷贝或4个拷贝的所述编码黑曲霉木聚糖酶的基因;

-6个拷贝的所述编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因;和

-4个拷贝的所述编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因,

(b) 在合成糊精培养基上培养并发酵所述步骤(a)中获得的酵母;和

(c) 选择至少一种菌株,其在发酵动力学上至少等于或大于于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株。

12. 提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 提供酿酒酵母菌株,其共表达编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因,其中所述黑曲霉葡萄糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:1编码,和编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因,其中所述酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:3编码;

(b) 基因改造所述步骤(a)中的酵母;使其进一步表达编码黑曲霉木聚糖酶的基因,其中所述黑曲霉木聚糖酶由核酸序列SEQ ID NO:5编码,

使得所述基因改造的酿酒酵母菌株包含:

-6个拷贝的所述编码黑曲霉葡萄糖淀粉酶的基因;

-4个拷贝的所述编码酿酒酵母糖化变种的葡萄糖淀粉酶的基因;和

-1个拷贝或4个拷贝的所述编码黑曲霉木聚糖酶的基因;

(c) 在合成糊精培养基上培养并发酵所述步骤(b)中获得的酵母;和

(d) 选择至少一种菌株,其在发酵动力学上至少等于或大于于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株。

13. 如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述步骤(a)的酿酒酵母是于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的酿酒酵母菌株。

14. 由生物质生产生物乙醇的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 预水解并液化来自生物质的淀粉;

(b) 使所述步骤(a)中获得的液化淀粉与权利要求1-8任一项所述的酿酒酵母菌株反应,以生产生物乙醇;和

(c) 提取所述步骤(b)中生产的生物乙醇。

15. 由生物质生产生物乙醇的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 预水解并液化来自生物质的淀粉;

(b) 使所述步骤(a)中获得的液化淀粉与权利要求9所述的酿酒酵母菌株反应,以生产生物乙醇;和

(c) 提取所述步骤(b)中生产的生物乙醇。

16. 由生物质生产生物乙醇的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 预水解并液化来自生物质的淀粉;

(b) 使所述步骤(a)中获得的液化淀粉与权利要求10所述的酿酒酵母菌株反应,以生产生物乙醇;和

(c) 提取所述步骤(b)中生产的生物乙醇。

17. 如权利要求1-8任一项所述的酿酒酵母菌株用于生产生物乙醇的用途。

18. 如权利要求9所述的酿酒酵母菌株用于生产生物乙醇的用途。

19. 如权利要求10所述的酿酒酵母菌株用于生产生物乙醇的用途。

表达外源葡糖淀粉酶和木聚糖酶的酿酒酵母菌株及其在生产生物乙醇中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及基因改造以共表达编码真菌来源和酿酒酵母糖化变体 (*Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*) 的葡糖淀粉酶的基因和编码真菌来源的木聚糖酶的基因的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株。这种菌株在生物燃料, 尤其是生物乙醇的生产中发现有特别的应用。本发明还涉及获得这些酵母的方法, 以及这些酵母在生产生物乙醇中的用途。

发明内容

[0002] 寻找化石燃料(石油、煤炭、天然气)的替代能源的需求源自不可再生能源的减少和对温室气体排放量上升的关注日益增加。来自森林、农产品或农业食品和/或副产品的植物生物质构成了用于生产工业化分子的重要碳源。从植物中含有的可发酵糖生产的乙醇被用于装配有内燃机的车辆中。近年来生物乙醇的生产获得了快速发展, 世界生物乙醇产量在不到10年时间里翻了一倍以上(2007年生产495亿升VS2016年1020亿升——www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/, 可再生燃料协会)。美国和巴西仍是两个最大的生物乙醇生产国, 总产量占全球产量的85%。

[0003] 所谓的第一代生物乙醇是通过发酵富含淀粉(玉米、大麦、小麦、木薯、马铃薯块茎等粮食)或蔗糖(甘蔗、甜菜、糖高粱等)的生物质中含有的己糖(六碳糖)而产生, 而所谓的二代生物乙醇通过农业废弃物(诸如谷物秸秆、玉米棒、森林废弃物、木材、能源作物(诸如柳枝稷)、短轮伐期或超短轮伐期矮林(例如杨木)中含有的纤维素和半纤维素转化得到。

[0004] 当前, 只有第一代生物乙醇以工业规模制备。工业制备包括使用酿酒酵母菌株, 其以高的酒精度、生产率和产量将来自生物质的葡萄糖发酵成乙醇。将淀粉转化为生物乙醇的方法涉及预水解并液化生物质淀粉, 将液化淀粉转化为可发酵糖(通过淀粉水解)以及将这些糖发酵为乙醇的过程——后两个步骤通常同时进行。淀粉水解需要所谓淀粉水解酶的作用。由于酿酒酵母通常不含此类酶, 从由淀粉组成的生物质生产乙醇以两步进行: 第一步向生物质添加淀粉分解酶以预水解并液化生物质中含有的淀粉, 和第二步使用其它酶(淀粉分解酶、酶混合物、蛋白酶和/或海藻糖酶等)水解液化的淀粉并使用酿酒酵母菌株以发酵由此释放的可发酵糖。

[0005] 为了简化从由淀粉组成的生物质生产生物乙醇的过程, 申请人已经开发了酿酒酵母菌株, 其包含整合到其基因组中的外源葡糖淀粉酶基因。这些基因改造的酿酒酵母菌株可同时进行液化淀粉的部分水解和乙醇发酵(WO 2017/037362)。尽管如此改造的酿酒酵母菌株性能有所提高, 但仍需要用于生产第一代乙醇的新型、改进的酵母菌株。

[0006] 发明简述

[0007] 总体来说, 本发明涉及酿酒酵母菌株, 其与通常用于生产第一代生物乙醇的专用酵母菌株相比以及包含整合到其基因组中的外源葡糖淀粉酶基因的酿酒酵母菌株(WO 2017/037362)相比, 性能得到改进。更具体地, 本发明的发明人已经开发了基因改造的酿酒

酵母菌株,所述菌株共表达几种异源葡糖淀粉酶基因和异源木聚糖酶基因。特别地,根据本发明的酿酒酵母菌株共表达编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因,以及真菌来源的木聚糖酶的基因。发明人证明,这些菌株能够水解从生物质提取的液化淀粉,同时有效地发酵了衍生自所述水解的糖。实际上,使用根据本发明所述的酵母菌株使得可以代替在将液化淀粉转化为生物乙醇过程中所需的外源酶的全部或一部分量,并且以比本领域已知菌株的产率更高的产率生产生物乙醇。

[0008] 因此,根据第一方面,本发明涉及酿酒酵母菌株,其特征在于,其共表达:

[0009] -编码真菌来源的木聚糖酶的基因;

[0010] -编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因;和

[0011] -编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因。

[0012] 在一些实施方案中,真菌来源的木聚糖酶是黑曲霉(*Aspergillus niger*)木聚糖酶或里氏木霉(*Trichoderma reesei*)木聚糖酶。特别地,真菌来源的木聚糖酶可以是由核酸序列SEQ ID NO:5编码的或由多肽序列SEQ ID NO:6或多肽序列SEQ ID NO:6的功能性变体组成的黑曲霉木聚糖酶。或者,真菌来源的木聚糖酶可以是由核酸序列SEQ ID NO:7编码的或由多肽序列SEQ ID NO:8或多肽序列SEQ ID NO:8的功能性变体组成的里氏木霉木聚糖酶。

[0013] 在某些实施方案中,来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶由核酸序列SEQ ID NO:3编码或由多肽序列SEQ ID NO:4或多肽序列SEQ ID NO:4的功能性变体组成。

[0014] 在某些实施方案中,真菌来源的葡糖淀粉酶选自下组:黑曲霉葡糖淀粉酶、扣囊复膜酵母菌(*Saccharomycopsis fibuligera*)葡糖淀粉酶、里氏木霉葡糖淀粉酶、嗜热单胞菌(*Thermomyces lanuginosus*)葡糖淀粉酶、米根霉(*Rhizopus oryzae*)葡糖淀粉酶和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)葡糖淀粉酶。特别地,真菌来源的葡糖淀粉酶可以是由核酸序列SEQ ID NO:1编码的或由多肽序列SEQ ID NO:2或多肽序列SEQ ID NO:2的功能性变体组成的黑曲霉葡糖淀粉酶。

[0015] 在某些实施方案中,根据本发明的酿酒酵母菌株,包含:

[0016] -m个拷贝的编码真菌来源的木聚糖酶的基因;

[0017] -n个拷贝的编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因;和

[0018] -p个拷贝的编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因,

[0019] 其中,m是1-10的整数,n是2-10的整数,且p是2-10的整数。

[0020] 在某些实施方案中,m是1或4。

[0021] 在一些实施方案中,n是6且p是4。

[0022] 在某些实施方案中,编码真菌来源的木聚糖酶的基因、编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因以及编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因被整合至根据本发明的酵母菌株的基因组中。

[0023] 在某些实施方案中,根据本发明的酿酒酵母菌株是于2017年4月26日以保藏号I-5201保藏于CNCM的菌株。

[0024] 另一方面,本发明还涉及获得可用于生产生物乙醇的酿酒酵母菌株的方法,所述方法包括如下步骤:

[0025] (a) 基因改造酿酒酵母,使其共表达编码真菌来源的木聚糖酶的基因,编码真菌来

源的葡糖淀粉酶的基因,和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因,或获得上述的酿酒酵母菌株;

[0026] (b) 在合成糊精培养基上培养并发酵步骤(a)中获得的酵母;和

[0027] (c) 选择至少一种菌株,其在发酵动力学上至少等于或大于于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株。

[0028] 另一方面,本发明还涉及提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率的方法,所述方法包括如下步骤:

[0029] (a) 提供共表达编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因的酿酒酵母菌株;

[0030] (b) 基因改造步骤(a)中的酵母;使其进一步表达编码真菌来源的木聚糖酶的基因;

[0031] (c) 在合成糊精培养基上培养并发酵步骤(b)中获得的酵母;和

[0032] (d) 选择至少一种菌株,其在发酵动力学上至少等于或大于于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株。

[0033] 在某些实施方案中,提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率的方法,其特征在于,步骤(a)所述的酿酒酵母是于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的酿酒酵母菌株。

[0034] 另一方面,本发明还涉及由生物质生产生物乙醇的方法,所述生物质方法包括如下步骤:

[0035] (a) 预水解并液化来自生物质的淀粉;

[0036] (b) 使步骤(a)中获得的液化淀粉与根据本发明的酿酒酵母菌株反应,以生产生物乙醇;和

[0037] (c) 提取步骤(b)中生产的生物乙醇。

[0038] 最后,本发明还涉及本文公开的酿酒酵母菌株用于生产生物乙醇的用途。

[0039] 本发明的某些优选实施方案的更详细描述如下。

[0040] 发明详述

[0041] 如上文所述,本发明涉及在生产第一代生物乙醇(特别是由包含淀粉的生物质生产的生物乙醇)中,具有高产率的酿酒酵母菌株。

[0042] I-基因改造的酿酒酵母菌株

[0043] 根据本发明的酿酒酵母菌株,其特征在于,其共表达:

[0044] -编码真菌来源的木聚糖酶的基因;

[0045] -编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因;和

[0046] -编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因。

[0047] 表述“酵母菌株”是指酵母细胞的相对均质群体。酵母菌株获自克隆,该克隆是获自单个酵母细胞的细胞群。在本发明上下文中,起始酿酒酵母菌株是可以被基因改造以引入根据本发明的异源木聚糖酶和葡糖淀粉酶基因的任何酿酒酵母菌株。在一些优选实施方案中,起始酿酒酵母菌株是已知的可用于生产生物乙醇的菌株,例如被用于第一代乙醇生产的酿酒酵母,其是可优化生产工艺的获利能力的专用菌株。这些酵母是本领域技术人员众所周知的,尤其是:Ethanol Red[®] (LEAF)、Thermosacc[®] (Lallemand)、Angel Super

Alcohol[®] (Angel) 和 **Fali**[®] (AB Mauri)。这些酵母的可预期能力是它们能够在工业条件水平的温度和pH范围内快速生产高浓度乙醇并消耗发酵培养基中的糖。

[0048] 如上所述,与发明人先前已开发的酿酒酵母菌株相比,即与其中引入编码来自酿酒酵母糖化变体的葡糖淀粉酶的基因和编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因使得可以获得具有优异淀粉水解能力的菌株(WO 2017/037362)的酿酒酵母菌株相比,根据本发明的菌株是改进的菌株。

[0049] 如本文所用,“编码葡糖淀粉酶的基因”表示当表达时,使得功能性葡糖淀粉酶蛋白形成的氨基酸序列。

[0050] 如本文所用,“葡糖淀粉酶”表示能够从直链淀粉和支链淀粉的非还原端水解粗淀粉或可溶性淀粉的 α -1,4糖苷键的酶。淀粉酶也称为淀粉葡萄糖苷酶或 γ -淀粉酶(Medline reference:EC 3.2.1.3)。除了作用于淀粉的 α -1,4-键外,葡糖淀粉酶还能够缓慢水解支链淀粉分子的 α -1,6-键,前提是序列中的相邻键为 α -1,4-键。

[0051] 术语“真菌来源的葡糖淀粉酶”是指来自真菌的任何葡糖淀粉酶,并且其相应的基因可被整合到酵母菌株的基因组中,使得该基因的表达导致功能性葡糖淀粉酶蛋白的形成。特别地,真菌来源的葡糖淀粉酶可以选自以其良好的酶活性而闻名的商业化葡糖淀粉酶。在本发明的上下文中,真菌来源的葡糖淀粉酶可以选自下组:黑曲霉葡糖淀粉酶、扣囊复膜酵母菌葡糖淀粉酶、里氏木霉葡糖淀粉酶、米根霉葡糖淀粉酶、米曲霉葡糖淀粉酶和嗜热单胞菌葡糖淀粉酶。这些葡糖淀粉酶是技术人员已知的,并且它们的序列可通过以下GenBank编号(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)获得:里氏木霉(ETS06561)、米根霉(BAA00033)、米曲霉(BAA00841)、嗜热单胞菌(ABQ23180)。

[0052] 在某些具体实施方案中,真菌来源的葡糖淀粉酶是黑曲霉葡糖淀粉酶或扣囊复膜酵母菌葡糖淀粉酶。黑曲霉葡糖淀粉酶由具有核酸序列SEQ ID NO:1的GLAA基因编码,且具有蛋白序列SEQ ID NO:2。扣囊复膜酵母菌葡糖淀粉酶由具有核酸序列SEQ ID NO:9的GLU0111基因编码,且具有蛋白序列SEQ ID NO:10。

[0053] 来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶由具有核酸序列SEQ ID NO:3的STA1基因编码,且具有蛋白序列SEQ ID NO:4。

[0054] 在某些实施方案中,根据本发明的酿酒酵母菌株,其特征在于,其共表达:

[0055] -编码真菌来源的木聚糖酶的基因;

[0056] -编码来自黑曲霉的葡糖淀粉酶的基因;和

[0057] -编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因。由此,例如,特别地,该酿酒酵母菌株的特征在于它含有核酸序列SEQ ID NO:1和核酸序列SEQ ID NO:3。可替代地或另外地,特别地,该酿酒酵母菌株的特征在于来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶具有蛋白序列SEQ ID NO:4,且来自黑曲霉的葡糖淀粉酶具有蛋白序列SEQ ID NO:2。

[0058] 根据本发明的酿酒酵母菌株与发明人此前开发的酿酒酵母菌株(WO 2017/037362)的区别在于,除了编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因外,它还共表达编码真菌来源的木聚糖酶的基因。

[0059] 如本文所用,“编码木聚糖酶的基因”表示表达时导致功能性木聚糖酶蛋白形成的氨基酸序列。

[0060] 如本文所用,“木聚糖酶”表示糖苷水解酶,其水解木聚糖中的键(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-木糖

苷键,从而生成木糖。木聚糖酶也被称为1,4- β -木聚糖内切酶(Medline reference:EC 3.2.1.8)。这些酶参与半纤维素的降解,半纤维素是植物细胞壁的主要成分之一。特别地,它们由真菌、细菌、酵母、海藻、原生动物、蜗牛、甲壳类动物、昆虫和某些种子产生,而不由哺乳动物产生。

[0061] 在本发明上下文中,木聚糖酶是真菌来源的木聚糖酶。术语“真菌来源的木聚糖酶”是指来自真菌的任何木聚糖酶,其相应的基因可被整合到酵母菌株的基因组中,由此使得该基因的表达可使得功能性木聚糖酶蛋白形成。特别地,真菌来源的木聚糖酶可以选自以其良好的酶活性而闻名的商业化木聚糖酶。在本发明上下文中,真菌来源的木聚糖酶可选自下组:黑曲霉木聚糖酶、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)木聚糖酶、塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)木聚糖酶、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)木聚糖酶和里氏木霉木聚糖酶。这些木聚糖酶是技术人员已知的,且其序列可通过以下GenBank编号(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)获得:黑曲霉(FJ785738)、泡盛曲霉(X78115)、塔宾曲霉(L26988)、构巢曲霉(Z49892)和里氏木霉(X69573)。

[0062] 在某些具体实施方案中,真菌来源的木聚糖酶是黑曲霉木聚糖酶或里氏木霉木聚糖酶。黑曲霉木聚糖酶由具有共有核酸序列SEQ ID NO:5的XYN1基因编码,并具有蛋白序列SEQ ID NO:6。里氏木霉木聚糖酶由具有共有核酸序列SEQ ID NO:7的XYN2基因编码,并且具有蛋白序列SEQ ID NO:8。

[0063] 表述“真菌来源的葡糖淀粉酶”和“来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶”不应该被严格解释:它们涵盖由上述核酸序列编码的真菌来源的葡糖淀粉酶和来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶,以及这些葡糖淀粉酶的功能性变体。类似地,如本文所用,术语“真菌来源的木聚糖酶”涵盖由上述核酸序列编码的真菌来源的木聚糖酶,以及这些木聚糖酶的功能性变体。

[0064] 典型地,根据本发明的葡糖淀粉酶或木聚糖酶的功能性变体具有与所述葡糖淀粉酶或木聚糖酶的蛋白序列分别具有至少80%、90%或95%,更特别地99%的同一性百分比的蛋白质序列。例如,黑曲霉葡糖淀粉酶的功能变体具有与序列SEQ ID NO:2具有至少80%、至少90%或至少95%,更特别地至少99%的同一性的蛋白序列;来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的功能性变体具有与序列SEQ ID NO:4具有至少80%、至少90%或至少95%,更特别地至少99%同一性的蛋白序列;黑曲霉木聚糖酶的功能性变体具有与序列SEQ ID NO:6具有至少80%、至少90%或至少95%,更特别地至少99%同一性的蛋白序列;以及里氏木霉木聚糖酶的功能变体具有与序列SEQ ID NO:8具有至少80%、至少90%或至少95%,更特别地99%同一性的蛋白质序列。

[0065] “同一性百分比”是氨基酸序列之间的比较,由比较在比较窗口上最优比对的两个序列来确定。本领域技术人员知道如何计算两个序列之间的同一性百分比,并且有许多工具可供使用。相对于另一个序列,两个序列之一可以具有氨基酸的插入、取代和缺失。

[0066] 选择根据本发明的葡糖淀粉酶和木聚糖酶的功能性变体在本领域技术人员的能力范围内。“葡糖淀粉酶的功能性变体”表示保留葡糖淀粉酶的酶活性并且具有类似的淀粉水解动力学特征的变体。“木聚糖酶的功能性变体”表示保留木聚糖酶的酶活性并具有相似的木聚糖水解释动力学的变体。在本申请的实验部分中描述了用于测量和比较淀粉水解动力学和木聚糖水解释动力学的方法(参见WO 2017/037362)。

[0067] 根据本发明的菌株可通过任何合适的方法获得。例如,本领域技术人员知晓将基因引入酵母菌株的多种方法,特别是通过使用包含表达盒的载体。“载体”表示可被插入外源核酸片段的任何DNA序列。载体能够将外源DNA引入宿主细胞。载体的实例是质粒、粘粒、病毒来源的载体。载体能够将异源基因直接整合至酵母基因组中,或使其在独立质粒中表达。将载体引入宿主细胞是本领域技术人员众所周知的方法。“Current Protocols in Molecular Biology”,13.7.1-13.7.10或Ellis et al.,Integrative Biology,2011,3(2),109-118中特别介绍了几种方法。

[0068] 根据本发明的基因改造可以同时或按顺序进行。因此,例如在某些实施方案中,根据本发明的酿酒酵母菌株是由本发明人先前开发并在W02017/037362中描述的酿酒酵母菌株制备的(即,由已经含有编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因以及编码来自酿酒酵母糖化变体的葡糖淀粉酶的基因的菌株制备)。或者,在其他实施方案中,通过将三个基因整合到酿酒酵母菌株中,例如参见上文的专用菌株中,来制备根据本发明的酿酒酵母菌株。在这些实施方案中,编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因,编码来自酿酒酵母糖化变体的葡糖淀粉酶的基因,和编码真菌来源的木聚糖酶的基因可被插入至同一个载体中,或者插入两个或三个单独的载体中。合适的载体可以是质粒。

[0069] 本发明的上下文中,用于将基因引入酿酒酵母菌株中的载体可以含有选择标记。“选择标记”是指其表达赋予包含它的酵母具备能够被选择的特性的基因。例如,它可以是抗生素抗性基因或允许酵母在特定培养基中生长的基因。

[0070] 在载体中,根据本发明的(葡糖淀粉酶或木聚糖酶)基因通常可操作地连接至启动子、终止子和/或其在酵母中表达所必需的任何其他序列。术语“可操作地连接”和“以可操作的方式连接”可互换使用,并且是指允许基因表达和任选地其调控(5'和3'调控序列)的元件,以及它们所控制的报道基因的序列之间的功能性连接。。技术人员知道如何选择在酿酒酵母中表达基因所需的启动子、终止子和其他序列。

[0071] 在本发明某些具体实施方案中,(葡糖淀粉酶和/或木聚糖酶)基因的表达由所谓的“强”启动子(即,具有高转录潜能的启动子,使得该基因被强表达)控制。在本发明的上下文中,例如,强启动子是pADH1启动子、pTEF启动子或pTDH3启动子。

[0072] 根据本发明的酿酒酵母菌株可以包含真菌来源的葡糖淀粉酶基因、来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶基因和真菌来源的木聚糖酶基因的至少一种的多拷贝。通常,根据本发明的酿酒酵母菌株包含m个拷贝的编码真菌来源的木聚糖酶的基因;n个拷贝的编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因;p个拷贝的编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因。其中,m是1-10的整数,n是2-10的整数,p是2-10的整数。因此,n和p可以独立地是2、3、4、5、6、7、8、9或10,并且m可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些具体实施方案中,m是1或4。在相同或其他具体实施方案中,n是6且p是4。

[0073] 特别地,本发明涉及酿酒酵母菌株,该酵母菌株由申请人根据《布达佩斯条约》,于2017年4月26日以保藏号I-5201保藏于CNCM(国家微生物培养物保藏中心,巴斯德研究所,鲁斯特·杜克多尔·鲁克斯街25-28号,鲁克斯75 724巴黎塞德克斯15号)。该菌株包含6个拷贝的黑曲霉葡糖淀粉酶基因,4个拷贝的酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶基因和1个拷贝的黑曲霉木聚糖酶基因。

[0074] II-获得用于生物乙醇生产的基因改造的酿酒酵母的方法

[0075] 本发明人同时开发了获得可用于生物乙醇生产的酿酒酵母菌株的方法。该方法包括以下步骤：

[0076] (a) 基因改造酿酒酵母,使其共表达编码真菌来源的木聚糖酶的基因、编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因以及编码来自酿酒酵母糖化变体的葡糖淀粉酶的基因或获得该酿酒酵母;

[0077] (b) 在合成糊精培养基上培养并发酵步骤(a)中获得的酵母;和

[0078] (c) 选择至少一种菌株,其在发酵动力学上至少等于或大于于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株。

[0079] 如本领域技术人员所知的,在基因改造步骤(a)之后,优选选择已经正确整合了引入的基因的克隆。由此,在步骤(b)中使用的步骤(a)的酵母是正确整合了编码真菌来源的木聚糖酶的基因,编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因的克隆。本领域技术人员知晓如何选择该克隆,例如通过使用在起始酿酒酵母中引入选择标记。本文中提供的实施例描述了用于选择克隆的方法的实例。在该实施例中,将步骤(a)中获得的克隆在丰富培养基(富含营养、YPG型培养基)中培养,然后将培养上清液转移到含有木聚糖作为碳源的基本培养基中。第二酵母,CelluX™酵母(其由申请人于2013年12月12日以保藏号I-4829保藏于CNCM)加入至反应培养基中。如果CelluX™菌株生长,则选择克隆(即,鉴定为已正确整合了引入的基因)。

[0080] 如本领域技术人员所知,上述方法步骤(a)中获得的酿酒酵母菌株是根据本发明的菌株,因此,它的特性与上一部分中描述的特性相同。

[0081] 本领域技术人员知晓如何在合成糊精培养基上进行这种酿酒酵母的发酵反应(步骤(b)),并确定最佳发酵条件。如本文所用,如本领域技术人员所知的,“合成糊精培养基”是指含有糊精的细胞培养基,优选含有糊精的酵母细胞培养基。例如,它是含有淀粉糊精(220g/kg),酵母提取物(5g/kg),尿素(2g/kg),磷酸二氢钾(1g/kg)以及矿物质和维生素(诸如维生素B1和维生素B6)的培养基。

[0082] 在步骤(c)中,通过比较其发酵动力学与由申请人于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的酿酒酵母菌株的发酵动力学,来选择在生物乙醇生产中有效和有用的酿酒酵母菌株。发酵动力学可以容易地通过本领域技术人员已知的各种技术测量。例如,可以通过发酵监测通过在一段时间内称重来测量发酵动力学。

[0083] 用作参考的菌株I-4997是发明人先前开发的并且在WO 2017/037362中描述的菌株之一。酿酒酵母I-4997菌株含有至少4个拷贝的编码黑曲霉葡糖淀粉酶的基因和至少3个拷贝的编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因。

[0084] 因此,通过本发明的方法筛选的菌株必然在合成糊精培养基中呈现出与酿酒酵母菌株I-4997相同或更好的发酵性能。由此,本发明人还开发了提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率的方法。

[0085] III-提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率的方法

[0086] 本发明还涉及提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率的方法,所述方法包括如下步骤:

[0087] (a) 提供共表达编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因的酿酒酵母菌株;

[0088] (b) 基因改造步骤(a)中的酵母;使其也表达编码真菌来源的木聚糖酶的基因;

[0089] (c) 在合成糊精培养基上培养并发酵步骤(b)中获得的酵母;和

[0090] (d) 选择至少一种菌株,其在发酵动力学上至少等于或大于于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株。

[0091] 步骤(a)中菌株可以是共表达编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因的任意酿酒酵母菌株。在某些实施方案中,真菌来源的葡糖淀粉酶选自下组:如上所述的黑曲霉葡糖淀粉酶、扣囊复膜酵母菌葡糖淀粉酶、里氏木霉葡糖淀粉酶、米根霉葡糖淀粉酶、米曲霉葡糖淀粉酶和嗜热单胞菌葡糖淀粉酶。在某些具体实施方案中,在步骤(a)的酿酒酵母菌株中存在外源基因的真菌起源的葡糖淀粉酶是黑曲霉葡糖淀粉酶,例如由核酸序列SEQ ID NO:1编码的黑曲霉葡糖淀粉酶或由多肽序列SEQ ID NO:2或多肽序列SEQ ID NO:2的功能性变体组成的黑曲霉葡糖淀粉酶。在相同或其他具体实施方案中,在步骤(a)的酿酒酵母菌株中存在的外源基因的酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶是由核酸序列SEQ ID NO:3编码的酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶,或由多肽序列SEQ ID NO:4或多肽序列SEQ ID NO:4的功能性变体组成的酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶。

[0092] 在某些具体实施方案中,步骤(a)的菌株是如WO 2017/037362中所述的共表达编码真菌来源的葡糖淀粉酶的基因和编码来自酿酒酵母糖化变种的葡糖淀粉酶的基因的酿酒酵母菌株。例如,步骤(a)的菌株是申请人于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的酿酒酵母菌株。

[0093] 如上所述,基因改造步骤(b)可以通过本领域技术人员已知的任何方法进行。

[0094] 如上所述,在基因改造步骤(b)之后,可以例如通过使用选择标记来选择已经被正确整合了编码真菌来源的木聚糖酶的基因的克隆。

[0095] 如本发明的选择方法所示,可以实施方法的步骤(c)和(d)来提高酿酒酵母菌株的生物乙醇产率。

[0096] 本发明还涉及通过根据本发明的选择或提高产率的方法获得的任何酵母菌株。本发明还涉及通过培养本发明的其中一种菌株获得的酵母。培养酵母菌株的方法是本领域已知的,并且本领域技术人员知晓如何根据其性质优化每种菌株的培养条件。

[0097] 对于从生物质,特别是从含有淀粉的生物质生产生物乙醇,本发明的酵母菌株和通过培养获得的酵母菌株是特别有益的。

[0098] IV-基因改造的酿酒酵母菌株用于生物乙醇生产的用途

[0099] 因此,本发明涉及根据本发明的酿酒酵母菌株用于从含有淀粉的生物质生产生物乙醇的用途。本发明还涉及由含有淀粉的生物质生产生物乙醇的方法,所述方法包括以下步骤:

[0100] (a) 预水解(即部分水解)并液化来自生物质的淀粉;

[0101] (b) 使步骤(a)中获得的含有预水解或液化淀粉的生物质与根据本发明的酿酒酵母菌株反应,以生产生物乙醇;和

[0102] (c) 提取步骤(b)中生产的生物乙醇。

[0103] 如本文所用,术语“生物质”是指植物来源的所有有机物,其在加工后可成为能量来源。优选地,在本发明的上下文中,生物质衍生自农产品或农业食品和/或副产品。例如,

生物质可以衍生自玉米、小麦、大麦、黑麦、高粱、木薯、小黑麦、马铃薯、红薯、甘蔗、甜菜、糖高粱。在本发明的上下文中,生物质含有淀粉。可以选择富含淀粉的生物质,或者可以选择例如衍生自玉米粒、大麦、小麦、木薯、马铃薯块茎等。

[0104] 根据本发明的方法的步骤(a)、(b)和(c)可以与常规的生物乙醇生产方法一样进行。这些步骤是本领域技术人员已知的。

[0105] 本发明特别适用于作为燃料的生物乙醇的生产,也适用于食品、化学、制药和化妆品工业的生物乙醇的生产。

[0106] 除非另有定义,否则说明书中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通专家通常所理解的相同的含义。类似地,本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用引入本文。

实施例

[0107] 下列实施例描述了本发明的一些实施方案。但是,应理解,实施例和附图仅以举例说明的方式给出,绝不限制本发明的范围。

附图说明

[0108] 图1: (A) 在“最大酒精含量”培养基中发酵期间,观察到保藏号为I-4997的CNCM菌株的转化株的质量损失。(B) 在“糊精”培养基中发酵期间,观察到保藏号为I-4997的菌株转化株的质量损失。

[0109] 图2: (A) 所研究的不同菌株的发酵动力学比较。(B) 比较乙醇含量,甘油/乙醇质量比和乙醇产率,这些值根据用于发酵所研究的不同菌株的底物的葡萄糖潜力计算得出。

[0110] 图3: 对于所研究的不同菌株,在发酵结束时测得的总糖的比较。

[0111] 实施例1: 含有1或4个拷贝的编码来自黑曲霉的木聚糖酶的基因(XYN1)或编码来自里氏木霉的木聚糖酶的基因(XYN2)的菌株I-4997的转化株的获得与表征

[0112] 用于克隆酿酒酵母菌株ER-GAND-8159-C1(即,申请人于2015年7月9日以保藏号I-4997保藏于CNCM的菌株)中的木聚糖酶活性的策略是基于使用多集成表达系统的。利用该系统,可以在给定的位点同时整合编码给定的木聚糖酶的基因的一个或多个拷贝。发明人选择整合来自黑曲霉的XYN1和来自里氏木霉的XYN2这两个基因之一的1或4个拷贝,以便测量拷贝数对木聚糖酶活性的可能的影响。

[0113] A. 获得表达质粒

[0114] 来自黑曲霉的木聚糖酶(XYN1)。预先使用衍生自黑曲霉菌株ATCC10577的遗传物质通过PCR扩增编码黑曲霉木聚糖酶的XYN1基因。然后,依赖于强pADH1启动子和tCYC1终止子,将PCR产物克隆到表达载体(内部开发的)中。然后,将所得质粒充当生成表达模块的模板,如以下B段所述。

[0115] 来自里氏木霉的木聚糖酶(XYN2)。使用的里氏木霉木聚糖酶由XYN2基因编码。使用的序列是cDNA版本,去除了其内含子,并通过密码子进行了优化,以改善酿酒酵母中蛋白质的翻译。具有依赖于pADH1/tCYC1对的XYN2基因的质粒用作PCR模板来合成表达模块。

[0116] B. 获得表达模块

[0117] 发明人采用的策略是,基于酵母在体内进行同源重组的天然能力,在给定位点上

一步将多个木聚糖酶基因表达模块同时整合到酿酒酵母菌株中。发明人已经确定了用于在BUD5基因座处整合模块的PCR引物。根据所开发的菌株,整合了1个或4个黑曲霉木聚糖酶或里氏木霉木聚糖酶表达模块,以及选择模块。

[0118] 每个扩增的模块在其启动子和终止子的两侧均具有重组序列(A1、B1、C1和D1)。这些序列由PCR引物的浮动尾部(floating tails)提供(表1),并允许模块通过这些重组基因序列之间的同源性进行特异性比对和重组。

[0119] 在多整合表达盒的5'和3'端,与给定基因座(例如BUD5基因座)同源的序列的存在允许在该给定基因座处同时整合表达模块和同源重组选择模块。

[0120] C. 获得和选择转化株

[0121] 获得转化株。对于每个构建体,等摩尔混合不同的模块(参见表2),以在菌株I-4997的BUD5基因座处整合黑曲霉木聚糖酶或里氏木霉木聚糖酶的1或4个拷贝以及选择模块。

[0122] 首先基于整合盒中选择模块的存在来选择具有正确整合表达模块的克隆。选择模块包含强启动子/终止子对和基因,该基因的表达赋予含有它的酵母能够使其在给定的培养基上被选择的特性。由此,发明人分离了衍生自每次转化的克隆。

[0123] 表1:使用的引物及合成的表达模块的命名的列表

	正义 (F) 和反义 (R) 寡核苷酸	模块
[0124]	选择基因 (F):CGCTCCAGAATTAGCGGACCTCTTGAGCGGTGAGCCTC TGGCAAAGAAGAGCATAACCGCTAGAGTACTT(SEQ ID NO: 11) (R):TCACTGTACGGTGAGAACGTAGATGGTGTGCGCATAGG CCACTAGTGGATCT(SEQ ID NO: 12)	M0
	(F):CACACCATCTACGTTCTCACCGTACAGTGAGCATAACC GCTAGAGTACTT (SEQ ID NO: 13) (R):CTCAAGAACGTAGGACGATAACTGGTTGGAAAGCGTA AACACGGAGTCAACAGCTTGCAAATTAAAGCCT(SEQ ID NO: 14)	M5-AN
	(F): SEQ ID NO: 13 (R):TTACGTAGACTGAGTAGCAACGGTTGAGGACAGCTTGC AAATTAAAGCCT (SEQ ID NO: 15)	M6-AN
	<i>A. niger</i> XYNI 基 因 (F):TCCTCAACCGTTGCTACTCAGTCTACGTAAGCATAACCG CTAGAGTACTT (SEQ ID NO: 16) (R):TCAGTAGCACAGAGAAGTGTAGGAGTGTAGCAGCTTGC AAATTAAAGCCT (SEQ ID NO: 17)	M7-AN

[0125]

<i>T. reesei</i> XYN2 基 因	(F):CTACACTCCTACACTTCTCTGTGCTACTGAGCATAACCG CTAGAGTACTT (SEQ ID NO: 18) (R):TTAGGATACATGCAGTAGACGAGGTAAGCACAGCTTGC AAATTAAAGCCT(SEQ ID NO: 19)	M8-AN
	(F):TGCTTACCTCGTCTACTGCATGTATCCTAAGCATAACCG CTAGAGTACTT(SEQ ID NO: 20) (R): SEQ ID NO: 14	M9-AN
	(F): SEQ ID NO: 13 (R): SEQ ID NO: 14	M5-TR
	(F): SEQ ID NO: 13 (R): SEQ ID NO: 15	M6-TR
	(F): SEQ ID NO: 16 (R): SEQ ID NO: 17	M7-TR
	(F): SEQ ID NO: 18 (R): SEQ ID NO: 19	M8-TR
	(F): SEQ ID NO: 20 (R): SEQ ID NO: 14	M9-TR

[0126] 表2:菌株I-4997转化前的模块混合

[0127]

拷贝数量	使用的模块	获得的菌株
1 拷贝 <i>A. niger</i> XYN1	M0	ER-GAND-XAN
	M5-AN	
4 拷贝 <i>A. niger</i> XYN1	M0	ER-GAND-XAN-4C
	M6-AN	
	M7-AN	
	M8-AN	
	M9-AN	

[0128]	1 拷贝 <i>T. reesei</i> XYN2	M0	ER-GAND-XTR1C
		M5-TR	
	1 拷贝 <i>T. reesei</i> XYN2	M0	ER-GAND-XTR-4C
		M6-TR	
		M7-TR	
		M8-TR	
		M9-TR	

[0129] 转化株的选择

[0130] (a) 与木聚糖酶活性相关的功能筛选。获得的转化株的筛选分两步进行。首先,将获得的转化株在含有桦木木聚糖的基本培养基中培养。实际上,分泌活性木聚糖酶的克隆具有将来自培养基的木聚糖水解成木糖的能力。在转化株生长的第一步之后,将CelluX™(一种能够消耗木糖的酵母)的接种物添加到每个孔中。观察到CelluX™在其中生长的孔被鉴定为含有分泌木聚糖酶活性的克隆。该途径使得可以鉴定表现出所需表型的转化株。为此,在培养结束时测量培养物的光密度(600nm处的OD)。

[0131] (b) 通过PCR验证选择的转化株。在发酵评估前,在鉴定为显示[木聚糖酶]+表型的那些转化株中,针对每个构建体验证了2个转化株的基因型。在选择转化株的基因组DNA上进行了一组PCR反应,以确认理论上存在于获得的构建物中的不同基因是否确实存在。

[0132] D. 选择的克隆的表型表征(木聚糖酶活性)

[0133] 固体培养基表型测试。在该测试中,将5μL培养上清液(5% YPG, 30°C, 24小时, 150rpm)置于含有桦木木聚糖的培养基上,在用1%刚果红染色并用1M NaCl脱色后,可以看到木聚糖的水解圈。对于所有所选的克隆,可观察到水解圈。

[0134] 液体培养基表型测试。该表型特征基于与选择转化株所用相同的原理(见上文)。在该测试中,将5μL培养的上清液(5% YPG)在桦木木聚糖(v/v)存在下于50°C孵育过夜,然后将混合物用在CelluX™的OD_{600nm}=0.05处校准的悬浮液接种。用HPLC分析在接种CelluX™之前和之后采集的样品,以确定CelluX™细胞生长过程中木糖的浓度。

[0135] 在液体培养基中的表型测试中获得的结果证实了所选克隆中CelluX™生长与木糖消耗之间的相关性。

[0136] 表3:选择的转化株的木糖消耗量的确定与CelluX™细胞生长的测量

[0137]

酵母培养物上清液	拷贝数	克隆数	木糖浓度(g/L)			CelluXTM 生长 OD (600 nm)		
			T0	Tf	减少 (%)	T0	Tf	乘数系数
ER-GAND-XAN	1	cl1	0.32	0.03	-92%	0.05	2.2	44 x
		cl4	0.19	0.08	-59%	0.05	0.8	16 x
	4	cl1	0.26	0.03	-89%	0.05	1.5	30 x
		cl9	0.21	0.03	-87%	0.05	1.5	30 x
ER-GAND-TR	1	cl3	0.22	0.08	-62%	0.05	0.9	18 x
		cl8	0.18	0.03	-81%	0.05	1.1	22 x
	4	cl2	0.23	0.03	-88%	0.05	1.9	38 x
		cl10	0.42	0.06	-87%	0.05	1.2	24 x
ER-GAND-8159 ^(a)	对照		0.16	0.03	-79%	0.05	0.4	8 x
	+ sXYN ^(b)		3.59	0.23	-93%	0.05	2.9	58 x
Ethanol Red ^{® (c)}	对照		0.14	0.06	-56%	0.05	0.4	8 x
	+ sXYN		3.52	0.25	-93%	0.05	2.9	58 x

[0138] (a) ER-GAND-8159是以保藏号 I-4997 保藏于 CNCM 的菌株

[0139] (b) sXYN = 12U/μL 里氏木霉木聚糖酶溶液

[0140] (c) Ethanol Red[®] 是本申请人于 2008 年 9 月 4 日以保藏号 I-4071 保藏于 CNCM 的菌株。

[0141] E. 选择的克隆在发酵中的评估

[0142] “最大酒精含量”培养基 (YFAM) 中针对乙醇生产性能的确定。为确定黑曲霉木聚糖酶和里氏木霉木聚糖酶表达模块的整合是否对转化株生产乙醇的能力存在影响, 在含有 280g/kg 蔗糖的所谓“最大酒精含量”培养基 (组成如下) 中对其进行了表征, 这使得可在给定的评估条件下测量其乙醇生产的潜力。

[0143] “最大酒精含量”培养基含有: 280g/kg 蔗糖, 5g/kg 酵母提取物, 4.7g/kg 磷酸二氢铵 (D.A.P.), 11.5g/kg 柠檬酸, 13.5g/kg 柠檬酸钠以及矿物质和维生素。

[0144] 无论是从动力学角度还是结果来看, 质量损失的监测没有发现“木聚糖酶”表达模块整合对转化株最大酒精生产潜力的负面影响, 具有 4 个拷贝的黑曲霉 XYN1 基因的克隆 1 除外, 其在动力学水平上的影响非常小 (参见图 1(A))。

[0145] 糊精培养基中的发酵。为确定选择的转化株是否经由葡萄糖淀粉酶的产生保留了其降解淀粉的能力, 在糊精培养基中评估了转化株。事实上, 用作整合木聚糖酶表达模块的宿主的菌株对应于具有两个不同来源的葡萄糖淀粉酶基因的 ER-GAND-8159 菌株 (CNCM I-4997)。糊精是淀粉水解产生的分子, 分泌葡萄糖淀粉酶的克隆能够将其降解为葡萄糖, 从而生产乙醇。所使用的发酵条件与 YFAM 培养基所使用的那些相同。

[0146] 如本领域技术人员所知, “糊精培养基”表示含有糊精的合成培养基。例如, 含有淀粉糊精 (220g/kg), 酵母提取物 (5g/kg), 尿素 (2g/kg), 磷酸二氢钾 (1g/kg) 以及矿物质和维

生素的合成培养基。

[0147] 与仅能发酵培养基中初始存在的葡萄糖(约10g/L)的Ethanol Red[®]相比,在糊精发酵培养基中测试的所有克隆均保留了其降解淀粉的能力(参见图1(B))。还应注意的是,与ER-GAND-8159对照相比,具有4个拷贝的编码里氏木霉木聚糖酶的XYN2基因的ER-GAND-XTR-4c c110克隆,和具有1个拷贝的该基因的ER-GAND-XTR-1c c18克隆,以及在较小程度上具有4个拷贝的该基因的ER-GAND-XTR-4c c12克隆,其质量损失动力学受到负面影响;而带有单拷贝XYN2的ER-GAND-XTR-1cc13克隆(CNCM I-5265)则并非如此,其前24小时的质量损失更快,而接下来40小时内的发酵的质量损失则与对照相同。这些结果表明,所选克隆相关的影响超过了其证明的整合XYN2基因的真正负面影响。

[0148] 另一方面,与ER-8159-GAND-8159对照(CNCM I-4997)相比,测试的四个具有1个或4个拷贝的XYN1基因(黑曲霉)的ER-GAND-XAN转化株在前24小时内具有显著改进的质量损失生产动力学。

[0149] 四个转化株保藏于CNCM中:菌株ER-GAND-XAN-1C c11于2017年4月26日以保藏号I-5201保藏于CNCM;ER-GAND-XAN-4C c19菌株于2017年12月20日以保藏号I-5264保藏于CNCM;ER-GAND-XTR-1C c13菌株于2017年12月20日以保藏号I-5265保藏于CNCM;ER-GAND-XTR-4C c12菌株于2017年12月20日以保藏号I-5266保藏于CNCM。

[0150] F. 结论

[0151] 在该实施例中描述的研究使得可以获得ER-GAND-8159菌株的转化株。使用单步多拷贝整合的策略,通过获得专门设计的表达模块,这些转化株拥有1或4个拷贝的黑曲霉木聚糖酶基因或里氏木霉木聚糖酶基因。其次,发明人致力于通过PCR验证所获得的转化株的基因型及其木聚糖水解表型,并确保其生产乙醇和水解淀粉的能力不受所进行的基因改造的负面影响。

[0152] 实施例2:菌株对生物乙醇生产底物的发酵性能的评估

[0153] A. 用于评估表现木聚糖酶活性的菌株的玉米水解产物的制备

[0154] 为评价本研究中产生的菌株,制备了用于生物乙醇生产的发酵培养基。该培养基与市场上的使用玉米的培养基接近。为此,将玉米粗粒(“Crème de Maïs”-MQ-FT-19, Moulons Waast)悬浮以获得具有在水中含约30%干物质的混合物。然后,使用40%的氢氧化钾溶液将该悬浮液的pH值调节至6,并以0.85mL酶/每公斤使用粗粒(mobilized grits)的比例添加 α -淀粉酶型酶(Liquozyme SC-DS, Novozymes)。然后,在85°C下对该悬浮液进行液化热处理3小时。热处理后释放的糖的典型组合物如下表4所示(测得的干物质:29.1%)。

[0155] 表4:液化底物中可用糖的组合物

[0156]	糖	浓度(g/kg)
	麦芽糖	23.9
	葡萄糖	6.3
	果糖	0.7
	甘油	0.3

[0157] 该液化底物通过酶法测得的总葡萄糖潜力为226g_{葡萄糖}/kg_{底物}。

[0158] B. 通过添加木聚糖酶基因改造的菌株的乙醇生产性能的评估

[0159] 与参照ER-GAND-8159(CNCM I-4997)相比,测试了四个转化株在液化底物上进行乙醇发酵的性能(2个引入黑曲霉木聚糖酶的克隆,一个具有1个拷贝的基因,另一个具有4个拷贝的基因;2个克隆每个都具有1个拷贝的里氏木霉木聚糖酶基因)。

[0160] 从被选择用于评估的菌株制备酵母膏。将被选择用于评估的所选五种菌株中的每种在培养皿上培养24小时,然后在使用前储存在冰箱中。然后,收集每种菌株,并将其用于在250mL圆底烧瓶中接种于100mL酸性培养基(如YM培养基)中。将该圆底烧瓶在26°C的培养箱中放置24小时。

[0161] 培养结束时,将每种培养基以4500rpm离心5分钟。除去上清液,添加150mL无菌水以洗涤酵母。然后,进行第二次离心,除去上清液,将沉淀物溶于20mL无菌水中,通过涡旋匀化并冷藏保存,然后用于接种发酵测试样品。

[0162] 进行发酵测试。对于每个评估的菌株,将100g液化底物置于250mL圆底烧瓶中。以尿素的形式以0.5g氮/每千克底物的比例添加矿物氮。然后,使用0.5N硫酸溶液将pH调节至5。然后,以0.5g酵母膏干物质/每千克底物的比例将每种以膏形式存储的菌株添加到培养基中。一旦将菌株添加到各自的圆底烧瓶中,将测试置于32°C的培养箱中,以100rpm的速度进行轨道振荡(orbital shaking)。

[0163] 通过在线获取发酵产生的CO₂压力(以等效质量损失表示)来监控测试。发酵结束时,收集产物(musts)并通过HPLC分析测量各种生化化合物的浓度并确定发酵平衡。

[0164] 获得的结果。图2(A)展示了观察到的发酵动力学情况。除ER-GAND-XTR-1C-c18菌株显示出初始动力学的延迟外,所有菌株在发酵的前36小时期间均显示出相似的发酵开始。36小时后,参照菌株ER-GAND-8159变慢,动力学相同的ER-GAND-XTR-1C-c13(I-5265)菌株也变慢。表达黑曲霉木聚糖酶基因的两种菌株在测试过程中均继续以较高的速率发酵并产生较高的CO₂量。在发酵54小时时,具有初始动力学延迟的ER-GAND-XTR-1C-c18菌株赶上了参照水平,并超过了该参照,稍微落后于两种ER-GAND-XAN菌株。

[0165] 在发酵结束时,进行分析以测量新转化株的性能增益。图2(B)展示了乙醇含量、甘油/乙醇质量比和乙醇产率的值,这些值是根据所用底物的葡萄糖潜力计算得到的。

[0166] 观察到ER-GAND-XAN转化株在乙醇生产上具有优势(滴度更高和产率更高)且甘油产率降低。对于ER-GAND-XTR菌株,仅克隆8在这些相同参数上具有优势,克隆3在性能上与参照相似。

[0167] 下表5展示了测试期间收集的所有数据,以将性能与参照进行比较。表格的左侧展示原始值,右侧展示相对于参考值观察到的增益。

[0168] 因此,在乙醇产率上具有增益的菌株在甘油产率上平行降低。但是,甘油的减少并不能解释乙醇产率的增加。产率的增益是由于各菌株产生的木聚糖酶的作用,使培养基中葡萄糖的消耗更加高效果。该结果通过图3所示发酵结束时总糖含量的测量得到证实:在乙醇产率方面具有优势的菌株具有降低的残余糖含量。

[0169] 表5:转化株性能测试结果

[0170]

	绝对值 (以%) 与参相比的相对增益(%)				
	参照*	C11*	C19*	C13*	C18*
葡萄糖消耗百分比 (% w/w)	95.9	96.4 (0.5)	96.2 (0.2)	96.0 (0.0)	96.6 (0.7)
乙醇含量 (g/kg)	113.6	116.9 (2.8)	117.0 (2.9)	113.3 (-0.2)	115.6 (1.7)
容积产率 (g/kg/h)	1.62	1.59 (-2.0)	1.60 (-1.9)	1.62 (-0.2)	1.58 (-3.1)
最大容积产率(g/kg/h)	6.1	6.0 (-1.8)	6.0 (-1.2)	6.0 (-1.8)	5.9 (-3.5)
乙醇产率 (% w/w)	39.7	40.7 (2.5)	40.7 (2.6)	39.6 (-0.2)	40.3 (1.7)
甘油/乙醇质量比 (% w/w)	8.9	8.5 (-5.4)	8.5 (-4.5)	8.9 (0.1)	8.3 (-7.6)
甘油产率 (% w/w)	3.43	3.31 (-3.6)	3.35 (-2.2)	3.42 (-0.2)	3.20 (-7.1)

[0171] *参照=ER-GAND-8159;C11=ER-GAND-XAN-1C-c11(I-5201);

[0172] C19=ER-GAND-XAN-4C-c19(I-5264);C13=ER-GAND-XTR-1C-c13(I-5265);以及

[0173] C18=ER-GAND-XTR-1C-c18。

[0174] 结论。在ER-GAND-8159菌株(I4997)中引入编码黑曲霉木聚糖酶的基因,显著改进了乙醇生产的性能。与参照菌株相比,在玉米水解产物上发酵测得的产率增益为2.5%-2.6%。通过使葡糖淀粉酶更好地接触培养基中的淀粉,同时降低菌株的甘油反应,木聚糖酶对发酵基质的作用对于葡糖淀粉酶作用是有益的。糖的这种双重增益(减少了流向甘油的糖并增加了由葡糖淀粉酶释放的葡萄糖)得到了更好的乙醇产量。尽管在此实施例略少,ER-GAND-XTR-1c菌株也具有类似的优势。

[0175] PCT

[0176] (原件为电子形式)

[0177] (该页不是国际申请的一部分且不计数为国际申请的页数)

[0178]

0-1	PCT/RO/134 表 有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT 细则第 13 条之二)	
0-1-1	软件版本	PCT 在线提交 版本 3.51.000.263e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	国际申请号	
0-3	申请人或代理人的案卷号	BCT190246 QT
1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	24
1-2	行号	5
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
1-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
1-3-3	保藏日期	2017 年 12 月 20 日 (20.12.2017)
1-3-4	保藏号	CNCM I-5265
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
2	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
2-1	页码	24
2-2	行号	16
2-3	保藏事项	
2-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
2-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
2-3-3	保藏日期	2017 年 12 月 20 日 (20.12.2017)
2-3-4	保藏号	CNCM I-5264
2-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
3	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
3-1	页码	4
3-2	行号	25

[0179] PCT

[0180] (原件为电子形式)

[0181] (该页不是国际申请的一部分且不计数为国际申请的页数)

[0182]

3-3	保藏事项	
3-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
3-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
3-3-3	保藏日期	2017 年 4 月 26 日 (26.04.2017)
3-3-4	保藏号	CNCM I-5201
3-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
4	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
4-1	页码	22
4-2	行号	22
4-3	保藏事项	
4-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
4-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
4-3-3	保藏日期	2008 年 9 月 4 日 (04.09.2008)
4-3-4	保藏号	CNCM I-4071
4-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
5	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
5-1	页码	13
5-2	行号	30
5-3	保藏事项	
5-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
5-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
5-3-3	保藏日期	2013 年 12 月 12 日 (12.12.2013)
5-3-4	保藏号	CNCM I-4829
5-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
6	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
6-1	页码	5
6-2	行号	7

[0183] PCT

[0184] (原件为电子形式)

[0185] (该页不是国际申请的一部分且不计数为国际申请的页数)

	6-3	保藏事项	
	6-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
	6-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
	6-3-3	保藏日期	2015 年 7 月 9 日 (09.07.2015)
	6-3-4	保藏号	CNCM I-4997
	6-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
[0186]	7	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
	7-1	页码	24
	7-2	行号	18
	7-3	保藏事项	
	7-3-1	保藏单位名称	CNCM 国家微生物保藏中心 (CNCM)
	7-3-2	保藏单位地址	巴斯德研究所, 法国, 巴黎 Cedex 15, Dr. Roux 街 25-28 号, 75724
	7-3-3	保藏日期	2017 年 12 月 20 日 (20.12.2017)
	7-3-4	保藏号	CNCM I-5266
	7-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
[0187]	由受理局填写		
[0188]	0-4	本表格与国际申请一起收到:	
		(是或否)	
	0-4-1	授权官员	
[0189]	由国际局填写		
[0190]	0-5	国际局收到本表格日期	
	0-5-1	授权官员	

序列表

<110> 乐斯福公司(LESAFFRE ET COMPAGNIE)

<120> 表达外源葡糖淀粉酶和木聚糖酶的酿酒酵母菌株及其在生产生物乙醇中的用途

<130> BFF170329

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1923

<212> DNA

<213> 黑曲霉

<400> 1

[0001] atgctcttta gatcattgct tgcactgtct ggtttagttt gcactggact tgccaatgct 60

atctctaaga gagcgacact agattcctgg ttaagtaacg aagccactgt tgcacgtaca 120

gccatactta acaacatagg tgccgatgga gcatgggtta gtggcgcgaga ttcggggata 180

gtcgttgcca gtccatcgac tgataatcct gactactttt atacctggac ccgtgatagt 240

gggttggtgc tgaaaacatt ggtagacctt ttcagaaacg gtgatacgtc cttgctatca 300

accatagaga attacattag cgcacaagct attgtacaag gcatttccaa tccgagtggc 360

gatctaagtt caggcgctgg ctggggtgaa cccaagttca atgtcgatga aactgcatat 420

acgggatcat ggggtagacc acaaagagat ggtccagctc taagagcaac tgccatgatt 480

ggatttggcc aatggctttt ggataatggc tacactagta cagccacaga cattgtttgg 540

cccttagtca gaaatgacct atcttatgtg gctcaatatt ggaaccaaac aggttatgac 600

	ttatgggaag aagtcaatgg ttcttcttc ttacaattg ccgtacagca tcgtgcactg	660
	gtggaaggat cggtttcgc cactgccgta ggttcctcat gtagttggtg tgattcaca	720
	gcgccagaga ttctatgcta ttgcagagc ttctggacag ggagttttat ctagccaac	780
	ttcgatagct ctatgccgg gaaagatgct aataccctat taggctcaat acacacgttt	840
	gacctgaag ctgcttgta cgattctaca ttcaaccgt gttctccag agctttggca	900
	aaccataaag aagtgttga ctcttttagg tctatctaca cctaaacga cggttgtcg	960
	gattcagaag ctgtggcagt tgggaggtat ccggaggata cgtactacaa tgtaatcct	1020
	tggttccttt gcacttggc agccgcggag cagttatatg atgcgttata tcaatggat	1080
	aagcagggtt ccttagaggt aactgatgtg tcgctggact tcttaaagc gctgtattca	1140
[0002]	gatgctgcta ccggtacgta ttctctgca tctcaacct attccagcat tgtggatgct	1200
	gtcaagactt ttgcagacgg attgtcagt atagttgaga ctcatgcagc ttctaaggt	1260
	tctatgtccg aacagtacga caaaagcgat ggtgaacaat tgcagcaag agacttgacc	1320
	tggtcttatg cagccttgtt aacagccaac aataggagaa atagcgttgt tccagctagt	1380
	tggggagaaa catccgcgtc atcagttcca ggaacgtgtg ctgtacttc agctattggt	1440
	acatattctt cagttacagt cacctctgg ccttcgatag tagctactgg aggaactact	1500
	acgaccgcta ctctacagg tagcgggtct gtgacttcca cctcaaagac aactgtact	1560
	gctagcaaaa catctacctc tactctgtcc acatcatgca ctacccaac tgcagtcga	1620
	gttacgtttg attgacagc tactacaacg tacggggaaa acatttactt ggtaggtagc	1680
	atcagtcaat tgggcgactg ggaaaccagc gatggtattg cattgagtc agataaatac	1740

acttcctctg atccattatg gtatgttacc gttacgttac cagctggtga gtcctttgaa 1800

tacaagtcca tcagaatcga gagtgatgac tctgtggaat gggaatctga tcccaataga 1860

gaatacacag tacctcaagc gtgtggtaca tcaacagcca ccgtaactga tacttggagg 1920

taa 1923

<210> 2

<211> 640

<212> PRT

<213> 黑曲霉

<400> 2

Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly

1 5 10 15

[0003]

Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser

20 25 30

Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala

35 40 45

Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser

50 55 60

Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser

65 70 75 80

Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr

85 90 95

Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val
100 105 110

Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu
115 120 125

Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp
130 135 140

Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile
145 150 155 160

[0004] Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr
165 170 175

Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln
180 185 190

Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser
195 200 205

Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser
210 215 220

Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln
225 230 235 240

Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe
245 250 255

Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr
260 265 270

Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp
275 280 285

Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu
290 295 300

Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser
305 310 315 320

[0005]

Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr
325 330 335

Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu
340 345 350

Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr
355 360 365

Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr
370 375 380

Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala
385 390 395 400

Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala
405 410 415

Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu
420 425 430

Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr
435 440 445

Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr
450 455 460

[0006] Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly
465 470 475 480

Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr
485 490 495

Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr
500 505 510

Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr
515 520 525

Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp
530 535 540

Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser
545 550 555 560

Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser
 565 570 575

Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr
 580 585 590

Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser
 595 600 605

Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val
610 615 620

[0007]

Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
625 630 635 640

<210> 3

<211> 2418

<212> DNA

<213> 酿酒酵母糖化变种

<400> 3

atgcaaagac catttctact cgcttatttg gtcttttcgc ttctatttaa ctcagctttg 60

ggttttccaa ctgcactagt tcctagagga tcctctcta gcaacatcac ttctccggt 120

ccatttcaa ctccattcag ctctgctact gaaagctttt ctactggcac tactgtcact 180

ccatcatcat ccaaataccc tggcagtaaa acagaaactt ctgtttcttc tacaaccgaa 240

	actaccattg ttccaactac aactacgact tctgtcataa caccatcaac aaccactatt	300
	accactacgg ttgtctctac aggaacaaac tctgccggtg aaactacttc tggatgctct	360
	ccaaagacca ttacaactac tgttccatgt tcaaccagtc caagegaaac cgcatcggaa	420
	tcaacaacca ctacacctac cacacctgta actacagttg tctcaaccac cgtcgttact	480
	actgagtatt ctactagtac aaaacaaggt ggtgaaatta caactacatt tgcacacaaa	540
	aacattccaa ccacttacct aactacaatt gctccaactt catcagtcac tacggttacc	600
	aatttcaccc caaccactat tactactacg gtttgcctta caggaacaaa ctctgccggt	660
	gaaactacct ctggatgctc tccaaagact gtcacaacaa ctgttccttg ttcaactggt	720
	actggcgaat acactactga agctaccgcc cctgttaca cagctgtcac aaccaccgtt	780
[0008]	gttaccactg aatcctctac ggggtactaac tccgctggtg agacgacaac tagttacaca	840
	acaaagtctg taccaaccac ctatgtattt gactttggca agggcattct cgatcaaagc	900
	tgcggcggtg tattttcaaa caacggctct tcgcaagtgc agctgcggga ttagtcttg	960
	atgaatggga cagtggata cgattcaaac ggcgcttggg acagtagtcc gctggaggag	1020
	tggctccagc gacagaaaaa agttccatc gaaagaatat ttgaaaatat tgggccccagc	1080
	gccgtgtatc cgtctatttt gcctggggtc gtgattgcgt caccatcgca aacgcacca	1140
	gactacttct accaatggat aaggacagc gcgttgacga taaacagtat tgtctctcat	1200
	tctgcggacc cggcaataga gacgttattg cagtacctga acgtttcatt ccactgcaa	1260
	agaaccaaca acacattggg cgctggcatt ggttacata acgatacagt ggttttggga	1320
	gaccctaagt ggaacgtcga caacacggct ttcacggaac cttgggggtcg tctcaaaac	1380

	gatggccctg ctcttgaag cattgccatc ttaaaatca tcgactacat caagcaatct	1440
	ggcactgatc tgggggcca gtaacccatc cagtcaccg cagatatctt tgatgatatt	1500
	gtacgttggg acctgaggtt cattattgac cactggaatt ctccggatt tgatctatgg	1560
	gaggaagtca atggcatgca ttctttact ttactgttac aactgtctgc agtggacagg	1620
	tcgtgtcgt attttaacgc ctgagaacgg tcgtctccct ttgtgaaga attgcgtcag	1680
	acacgccggg acatctccaa gtttttagtg gaccctgcga atgggtttat caacggcaag	1740
	tacaattata ttgttgagac acctatgatt gccgacacat tgagatccgg actggacata	1800
	tccactttat tagctcgaa caccgtccac gatgcgcat ctgcttccca tcttccgttc	1860
	gatatcaatg acctgcccgt cctgaacacg ttgcaccatt tgatgttgca catgcgttcg	1920
[0009]	atatacccca tcaacgatag ctccaaaaat gcaacgggta ttgccctggg ccggtatcct	1980
	gaggacgtat atgatggata tggcgttggc gagggaaatc cctgggtcct ggccacgtgt	2040
	gccgttcaa caacgttta tcagctcatt tacagacaca tctctgagca gcatgacttg	2100
	gttgtcccaa tgaacaacga ttgtcgaac gcattttgga gcgagctggt atttccaac	2160
	ctcacgactt tgggaaatga cgaaggctat ttgattttgg agttcaatac acctgccttc	2220
	aatcaaacca taaaaaaat ctccaacta gctgattcat ttcttggta agctgaaagc	2280
	cacgtgggaa cagacgggga actaagtga caatttaaca aatacacagg gtttatgcag	2340
	ggtgccaac accttacctg gtcctatact tcattctggg atgcctatca aataagacaa	2400
	gaagttttac agagtttg	2418

<210> 4

<211> 806

<212> PRT

<213> 酿酒酵母糖化变种

<400> 4

Met Gln Arg Pro Phe Leu Leu Ala Tyr Leu Val Leu Ser Leu Leu Phe

1 5 10 15

Asn Ser Ala Leu Gly Phe Pro Thr Ala Leu Val Pro Arg Gly Ser Ser

20 25 30

Ser Ser Asn Ile Thr Ser Ser Gly Pro Ser Ser Thr Pro Phe Ser Ser

35 40 45

[0010]

Ala Thr Glu Ser Phe Ser Thr Gly Thr Thr Val Thr Pro Ser Ser Ser

50 55 60

Lys Tyr Pro Gly Ser Lys Thr Glu Thr Ser Val Ser Ser Thr Thr Glu

65 70 75 80

Thr Thr Ile Val Pro Thr Thr Thr Thr Thr Ser Val Ile Thr Pro Ser

85 90 95

Thr Thr Thr Ile Thr Thr Thr Val Cys Ser Thr Gly Thr Asn Ser Ala

100 105 110

Gly Glu Thr Thr Ser Gly Cys Ser Pro Lys Thr Ile Thr Thr Thr Val

115 120 125

Pro Cys Ser Thr Ser Pro Ser Glu Thr Ala Ser Glu Ser Thr Thr Thr
130 135 140

Ser Pro Thr Thr Pro Val Thr Thr Val Val Ser Thr Thr Val Val Thr
145 150 155 160

Thr Glu Tyr Ser Thr Ser Thr Lys Gln Gly Gly Glu Ile Thr Thr Thr
165 170 175

Phe Val Thr Lys Asn Ile Pro Thr Thr Tyr Leu Thr Thr Ile Ala Pro
180 185 190

Thr Ser Ser Val Thr Thr Val Thr Asn Phe Thr Pro Thr Thr Ile Thr
195 200 205

[0011]

Thr Thr Val Cys Ser Thr Gly Thr Asn Ser Ala Gly Glu Thr Thr Ser
210 215 220

Gly Cys Ser Pro Lys Thr Val Thr Thr Thr Val Pro Cys Ser Thr Gly
225 230 235 240

Thr Gly Glu Tyr Thr Thr Glu Ala Thr Ala Pro Val Thr Thr Ala Val
245 250 255

Thr Thr Thr Val Val Thr Thr Glu Ser Ser Thr Gly Thr Asn Ser Ala
260 265 270

Gly Lys Thr Thr Thr Ser Tyr Thr Thr Lys Ser Val Pro Thr Thr Tyr
275 280 285

Val Phe Asp Phe Gly Lys Gly Ile Leu Asp Gln Ser Cys Gly Gly Val
290 295 300

Phe Ser Asn Asn Gly Ser Ser Gln Val Gln Leu Arg Asp Val Val Leu
305 310 315 320

Met Asn Gly Thr Val Val Tyr Asp Ser Asn Gly Ala Trp Asp Ser Ser
325 330 335

Pro Leu Glu Glu Trp Leu Gln Arg Gln Lys Lys Val Ser Ile Glu Arg
340 345 350

[0012] Ile Phe Glu Asn Ile Gly Pro Ser Ala Val Tyr Pro Ser Ile Leu Pro
355 360 365

Gly Val Val Ile Ala Ser Pro Ser Gln Thr His Pro Asp Tyr Phe Tyr
370 375 380

Gln Trp Ile Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ile Asn Ser Ile Val Ser His
385 390 395 400

Ser Ala Asp Pro Ala Ile Glu Thr Leu Leu Gln Tyr Leu Asn Val Ser
405 410 415

Phe His Leu Gln Arg Thr Asn Asn Thr Leu Gly Ala Gly Ile Gly Tyr
420 425 430

Thr Asn Asp Thr Val Ala Leu Gly Asp Pro Lys Trp Asn Val Asp Asn
435 440 445

Thr Ala Phe Thr Glu Pro Trp Gly Arg Pro Gln Asn Asp Gly Pro Ala
450 455 460

Leu Arg Ser Ile Ala Ile Leu Lys Ile Ile Asp Tyr Ile Lys Gln Ser
465 470 475 480

Gly Thr Asp Leu Gly Ala Lys Tyr Pro Phe Gln Ser Thr Ala Asp Ile
485 490 495

Phe Asp Asp Ile Val Arg Trp Asp Leu Arg Phe Ile Ile Asp His Trp
500 505 510

[0013]

Asn Ser Ser Gly Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Met His Phe
515 520 525

Phe Thr Leu Leu Val Gln Leu Ser Ala Val Asp Arg Ser Leu Ser Tyr
530 535 540

Phe Asn Ala Ser Glu Arg Ser Ser Pro Phe Val Glu Glu Leu Arg Gln
545 550 555 560

Thr Arg Arg Asp Ile Ser Lys Phe Leu Val Asp Pro Ala Asn Gly Phe
565 570 575

Ile Asn Gly Lys Tyr Asn Tyr Ile Val Glu Thr Pro Met Ile Ala Asp
580 585 590

Thr Leu Arg Ser Gly Leu Asp Ile Ser Thr Leu Leu Ala Ala Asn Thr
595 600 605

Val His Asp Ala Pro Ser Ala Ser His Leu Pro Phe Asp Ile Asn Asp
610 615 620

Pro Ala Val Leu Asn Thr Leu His His Leu Met Leu His Met Arg Ser
625 630 635 640

Ile Tyr Pro Ile Asn Asp Ser Ser Lys Asn Ala Thr Gly Ile Ala Leu
645 650 655

[0014] Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Asp Gly Tyr Gly Val Gly Glu Gly
660 665 670

Asn Pro Trp Val Leu Ala Thr Cys Ala Ala Ser Thr Thr Leu Tyr Gln
675 680 685

Leu Ile Tyr Arg His Ile Ser Glu Gln His Asp Leu Val Val Pro Met
690 695 700

Asn Asn Asp Cys Ser Asn Ala Phe Trp Ser Glu Leu Val Phe Ser Asn
705 710 715 720

Leu Thr Thr Leu Gly Asn Asp Glu Gly Tyr Leu Ile Leu Glu Phe Asn
725 730 735

Thr Pro Ala Phe Asn Gln Thr Ile Gln Lys Ile Phe Gln Leu Ala Asp
740 745 750

Ser Phe Leu Gly Gln Ala Glu Ser His Val Gly Thr Asp Gly Glu Leu
755 760 765

Ser Glu Gln Phe Asn Lys Tyr Thr Gly Phe Met Gln Gly Ala Gln His
770 775 780

Leu Thr Trp Ser Tyr Thr Ser Phe Trp Asp Ala Tyr Gln Ile Arg Gln
785 790 795 800

Glu Val Leu Gln Ser Leu
805

[0015]

<210> 5

<211> 636

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码黑曲霉木聚糖酶的 XYN1 基因的共有序列

<400> 5

atgaaggatca ctgcggcttt tgcaggtctt ttggtcacgg cattcgccgc tcctgtgccg 60

gaacctgttc tgggtgcgcg aagtgtgtgt attactacg tgcaaaacta caacggcaac 120

cttggtgatt tcacctatga cgagagtgcc ggaacatttt ccatgtactg ggaagatgga 180

gtgagctccg actttgtcgt tggctcgggc tggaccactg gttcttctaa cgctatcacc 240

tactctgccg aatacagcgc ttctggctcc tcttctacc tcgtgtgta cggctgggtc 300

aactatcctc aggctgaata ctacatcgtc gaggattacg gtgattacaa cccttgcagc 360
tcggccacaa gccttgggtac cgtgtactct gatggaagca cctaccaagt ctgcaccgac 420
actcgaacta acgaaccgtc catcacggga acaagcacgt tcacgcagta cttctccgtt 480
cgagagagca cgcgcacatc tggaacggtg actgttgcca accatttcaa cttctgggcg 540
cagcatgggt tcggaaatag cgacttcaat tatcaggta tggcagtga agcatggagc 600
ggtgctggca gcgccagtgt cacgatctcc tcttaa 636

<210> 6

<211> 211

<212> PRT

<213> 黑曲霉

[0016] <400> 6

Met Lys Val Thr Ala Ala Phe Ala Gly Leu Leu Val Thr Ala Phe Ala
1 5 10 15

Ala Pro Val Pro Glu Pro Val Leu Val Ser Arg Ser Ala Gly Ile Asn
20 25 30

Tyr Val Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Asp Phe Thr Tyr Asp Glu
35 40 45

Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp Gly Val Ser Ser Asp
50 55 60

Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser Asn Ala Ile Thr

65	70	75	80
Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Val			
85	90	95	
Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asp			
100	105	110	
Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr Ser Leu Gly Thr Val			
115	120	125	
Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys Thr Asp Thr Arg Thr Asn			
130	135	140	
[0017]			
Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr Gln Tyr Phe Ser Val			
145	150	155	160
Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Ala Asn His Phe			
165	170	175	
Asn Phe Trp Ala Gln His Gly Phe Gly Asn Ser Asp Phe Asn Tyr Gln			
180	185	190	
Val Met Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala Gly Ser Ala Ser Val Thr			
195	200	205	
Ile Ser Ser			
210			

<210> 7

<211> 672

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 无内含子的 XYN2 基因共有序列，编码里氏木霉的木聚糖酶

<400> 7

atggtttctt tcacttcttt gttagctggt gttagctgcta tctctggtgt tttagctgct 60

ccagctgctg aagtgaatc tgttagctgt gaaaagagac agacgattca gcccggcacg 120

ggctacaaca acggctactt ctactcttac tggaacgatg gccacggcgg cgtgacgtac 180

accaatggtc cggcggggca gtctccgtc aactggcca actcgggcaa cttagctggc 240

ggcaagggat ggcagcccgg caccaagaac aaggtcatca acttctcggg cagctacaac 300

[0018]

cccaacggca acagctacct ctccgtgtac ggctggctcc gcaacccct gatcgagtac 360

tacatcgtcg agaacttgg cacctacaac ccgtccacgg gcgccacca gctgggcgag 420

gtcacctccg acggcagcgt ctacgacatt taccgcacgc agcgcgtcaa ccagccgtcc 480

atcatcgga cggccacctt ttaccagtac tggctccgtcc gccgcaacca ccgctcgagc 540

ggctccgtca acacggcgaa ccacttcaac gcgtgggctc agcaaggcct gacgctcggg 600

acgatggatt accagattgt tgccgtggag ggttacttta gctctggctc tgcttccatc 660

accgtcagct aa 672

<210> 8

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 里氏木霉木聚糖酶蛋白序列

<400> 8

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

Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Val Glu Ser Val Ala Val Glu Lys
 20 25 30

Arg Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr
 35 40 45

[0019]

Ser Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro
 50 55 60

Gly Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly
65 70 75 80

Gly Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser
 85 90 95

Gly Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp
 100 105 110

Ser Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr
 115 120 125

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

Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser
145 150 155 160

Ile Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn
165 170 175

His Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp
180 185 190

Ala Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala
195 200 205

[0020]

Val Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
210 215 220

<210> 9

<211> 1545

<212> DNA

<213> 扣囊复膜酵母菌

<400> 9

atgatcagat tgaccgtttt ctgaccgct gtttttgctg ctgttgcttc ttgtgtcca 60

gttgaattgg ataagagaaa caccggatc ttccaagctt attctggta taccgttgc 120

agatctaact tcaccaatg gattcatgaa caaccagctg ttcttggtta ctactgttg 180

caaaacatcg attacccaga aggtcaattc aaatctgcta aaccaggtgt tgtgttgct 240

	tctccatcta catctgaacc agattacttc taccaatgga ctgagatac cgctattacc	300
	ttcttgctct tgattgctga agttgaagat cattcttct ccaacactac ctgggctaag	360
	gttgctgaat attacatttc caacacctac accttgcaaa gagtttctaa tccatccggt	420
	aacttcgatt ctccaaatca tgatggtttg ggtgaaccta agttcaacgt tgatgatact	480
	gcttatacag ctcttgggg tagaccacaa aatgatggtc cagctttgag agcttacgt	540
	atttctagat actgaacgc tgttgctaag cacaacaacg gtaaattatt attggccggt	600
	caaacggta ttcttattc ttctgcttc gatatctact ggaagattat taagccagac	660
	ttgcaacatg ttctactca ttggctacc tctggtttg atttgaggga agaaaatcaa	720
	ggtactcatt tctcaccgc ttgggtcaa ttgaaggctt tgtcttacgg tattccattg	780
[0021]	tctaagacct acaatgatcc aggtttcact tcttggttg aaaaacaaaa ggatgccttg	840
	aactcctaca ttaactcttc cggtttcgtt aactctggta aaaagcacat cgttgaatct	900
	ccacaattgt catctagagg tggtttggat tctgctactt atattgctgc ctgtacacc	960
	catgatatcg gtgatgatga tacttacacc ccattcaatg ttgataactc ctacgtttg	1020
	aactccttgt attacctatt ggtcgacaac aagaacagat acaagatcaa cggtaactac	1080
	aaagctggtg ctgctgttg tagataacct gaagatgttt acaacgggtg tggacttct	1140
	gaaggtaatc catggcaatt ggctactgct tatgctggtc aaactttta caccttgcc	1200
	tacaattcct tgaagaacaa gaagaactg gtcacgaaa agttgaacta cgactgtac	1260
	aactccttca ttgctgattt gtccaagatt gattcttct acgcttctaa ggattcttg	1320
	actttgacct acggttccga taactacaag aacgttatca agtccttgtt gcaattcgg	1380

gactcattct tgaaggtttt gttggatcac atcgatgaca acggtcaatt gactgaagaa 1440

atcaacagat acaccggttt tcaagctggt gcagtttctt tgacttggtc atctggttct 1500

ttgttgtctg ctaatagagc cagaaacaag ttgatcgaat tattg 1545

<210> 10

<211> 515

<212> PRT

<213> 扣囊复膜酵母菌

<400> 10

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

1 5 10 15

[0022]

Ser Cys Val Pro Val Glu Leu Asp Lys Arg Asn Thr Gly His Phe Gln

20 25 30

Ala Tyr Ser Gly Tyr Thr Val Ala Arg Ser Asn Phe Thr Gln Trp Ile

35 40 45

His Glu Gln Pro Ala Val Ser Trp Tyr Tyr Leu Leu Gln Asn Ile Asp

50 55 60

Tyr Pro Glu Gly Gln Phe Lys Ser Ala Lys Pro Gly Val Val Val Ala

65 70 75 80

Ser Pro Ser Thr Ser Glu Pro Asp Tyr Phe Tyr Gln Trp Thr Arg Asp

85 90 95

Thr Ala Ile Thr Phe Leu Ser Leu Ile Ala Glu Val Glu Asp His Ser
100 105 110

Phe Ser Asn Thr Thr Leu Ala Lys Val Val Glu Tyr Tyr Ile Ser Asn
115 120 125

Thr Tyr Thr Leu Gln Arg Val Ser Asn Pro Ser Gly Asn Phe Asp Ser
130 135 140

Pro Asn His Asp Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Asp Thr
145 150 155 160

Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Gly Arg Pro Gln Asn Asp Gly Pro Ala Leu
165 170 175

[0023]

Arg Ala Tyr Ala Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Ala Val Ala Lys His Asn
180 185 190

Asn Gly Lys Leu Leu Leu Ala Gly Gln Asn Gly Ile Pro Tyr Ser Ser
195 200 205

Ala Ser Asp Ile Tyr Trp Lys Ile Ile Lys Pro Asp Leu Gln His Val
210 215 220

Ser Thr His Trp Ser Thr Ser Gly Phe Asp Leu Trp Glu Glu Asn Gln
225 230 235 240

Gly Thr His Phe Phe Thr Ala Leu Val Gln Leu Lys Ala Leu Ser Tyr

245 250 255

Gly Ile Pro Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Asp Pro Gly Phe Thr Ser Trp

260 265 270

Leu Glu Lys Gln Lys Asp Ala Leu Asn Ser Tyr Ile Asn Ser Ser Gly

275 280 285

Phe Val Asn Ser Gly Lys Lys His Ile Val Glu Ser Pro Gln Leu Ser

290 295 300

Ser Arg Gly Gly Leu Asp Ser Ala Thr Tyr Ile Ala Ala Leu Ile Thr

305 310 315 320

[0024]

His Asp Ile Gly Asp Asp Asp Thr Tyr Thr Pro Phe Asn Val Asp Asn

325 330 335

Ser Tyr Val Leu Asn Ser Leu Tyr Tyr Leu Leu Val Asp Asn Lys Asn

340 345 350

Arg Tyr Lys Ile Asn Gly Asn Tyr Lys Ala Gly Ala Ala Val Gly Arg

355 360 365

Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Asn Gly Val Gly Thr Ser Glu Gly Asn Pro

370 375 380

Trp Gln Leu Ala Thr Ala Tyr Ala Gly Gln Thr Phe Tyr Thr Leu Ala

385 390 395 400

Tyr Asn Ser Leu Lys Asn Lys Lys Asn Leu Val Ile Glu Lys Leu Asn
405 410 415

Tyr Asp Leu Tyr Asn Ser Phe Ile Ala Asp Leu Ser Lys Ile Asp Ser
420 425 430

Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ser Leu Thr Leu Thr Tyr Gly Ser Asp Asn
435 440 445

Tyr Lys Asn Val Ile Lys Ser Leu Leu Gln Phe Gly Asp Ser Phe Leu
450 455 460

[0025] Lys Val Leu Leu Asp His Ile Asp Asp Asn Gly Gln Leu Thr Glu Glu
465 470 475 480

Ile Asn Arg Tyr Thr Gly Phe Gln Ala Gly Ala Val Ser Leu Thr Trp
485 490 495

Ser Ser Gly Ser Leu Leu Ser Ala Asn Arg Ala Arg Asn Lys Leu Ile
500 505 510

Glu Leu Leu
515

<210> 11

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223> 正义引物 MCI-pADH1-BUD5-F		
<400> 11		
cgctccagaa ttagcggacc tcttgagcgg tgagcctctg gcaaagaaga gcataaccgc	60	
tagagtactt	70	
<210> 12		
<211> 52		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 反义引物 A1-Gibson AMG		
<400> 12		
[0026] tcactgtacg gtgagaacgt agatgggtg cgcataggcc actagtggat ct	52	
<210> 13		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 正义引物 A2-Gibson AMG		
<400> 13		
cacaccatct acgttctcac cgtacagtga gcataaccgc tagagtactt	50	
<210> 14		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> 人工序列		

	<220>		
	<223> 反义引物 MCI-tCYC1-BUD5-r		
	<400> 14		
	ctcaagaacg taggacgata actggttgga aagcgtaa acggagtcaa cagcttgcaa	60	
	attaaagcct	70	
	<210> 15		
	<211> 50		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义引物 B1-Gibson AMG		
	<400> 15		
[0027]	ttacgtagac tgagtagcaa cggltgagga cagcttgcaa attaaagcct	50	
	<210> 16		
	<211> 50		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 正义引物 B2-Gibson AMG		
	<400> 16		
	tcctcaaccg ttgctactca gtctacgtaa gcataaccgc tagagtactt	50	
	<210> 17		
	<211> 50		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		

	<220>		
	<223> 反义引物 C1-Gibson AMG		
	<400> 17		
	tcagtagcac agagaagtggt aggagtgtag cagcttgcaa attaaagcct	50	
	<210> 18		
	<211> 50		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 正义引物 C2-Gibson AMG		
	<400> 18		
	ctacactcct acacttctct gtgctactga gcataaccgc tagagtactt	50	
[0028]	<210> 19		
	<211> 50		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 反义引物 D1-Gibson AMG		
	<400> 19		
	ttaggataca tgcagtagac gaggtgaagca cagcttgcaa attaaagcct	50	
	<210> 20		
	<211> 50		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 正义引物 D2-Gibson AMG		
[0029]	<400> 20		
	tgcttacctc gtctactgca tgtatcctaa gcataaccgc tagagtactt	50	

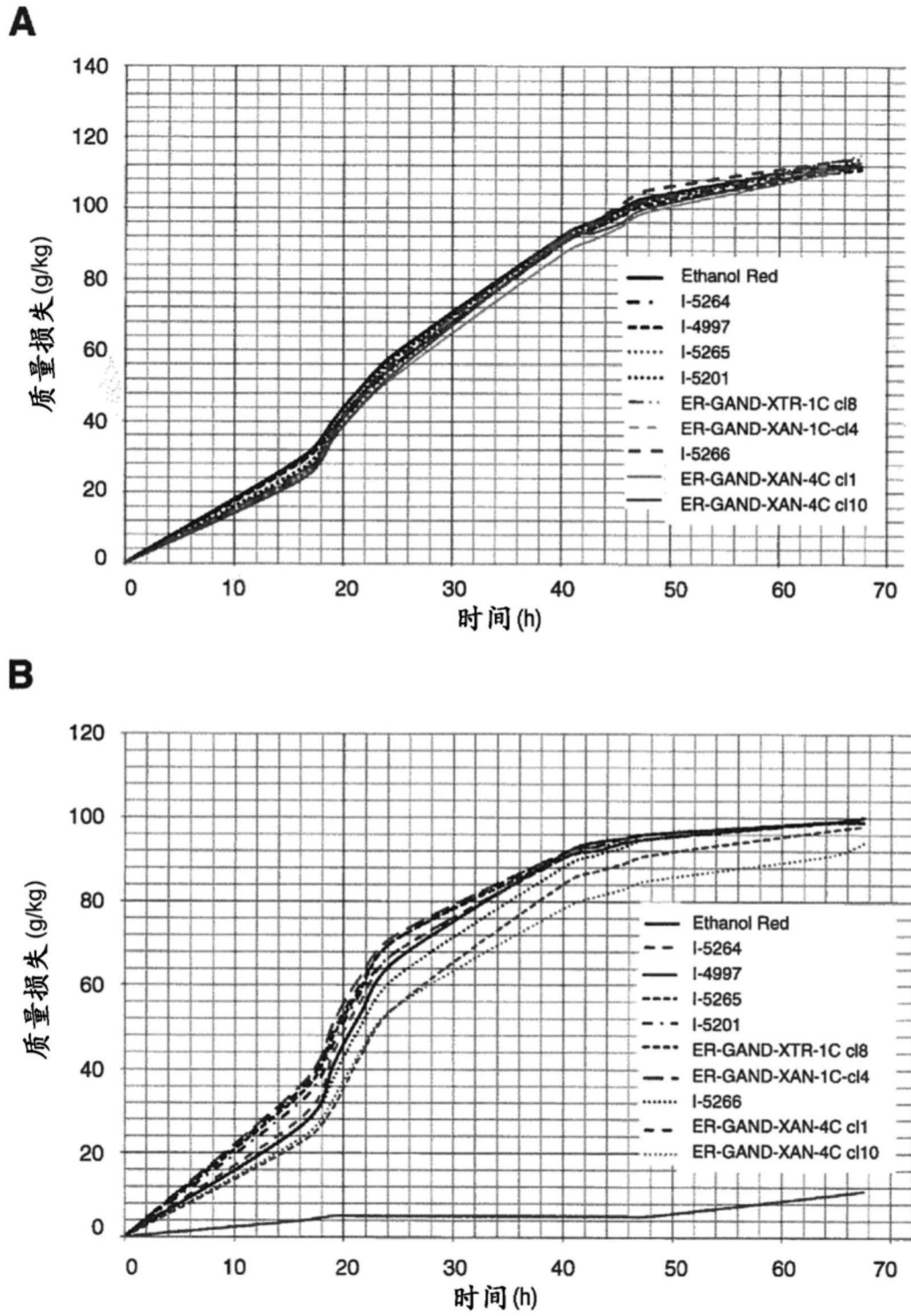


图1

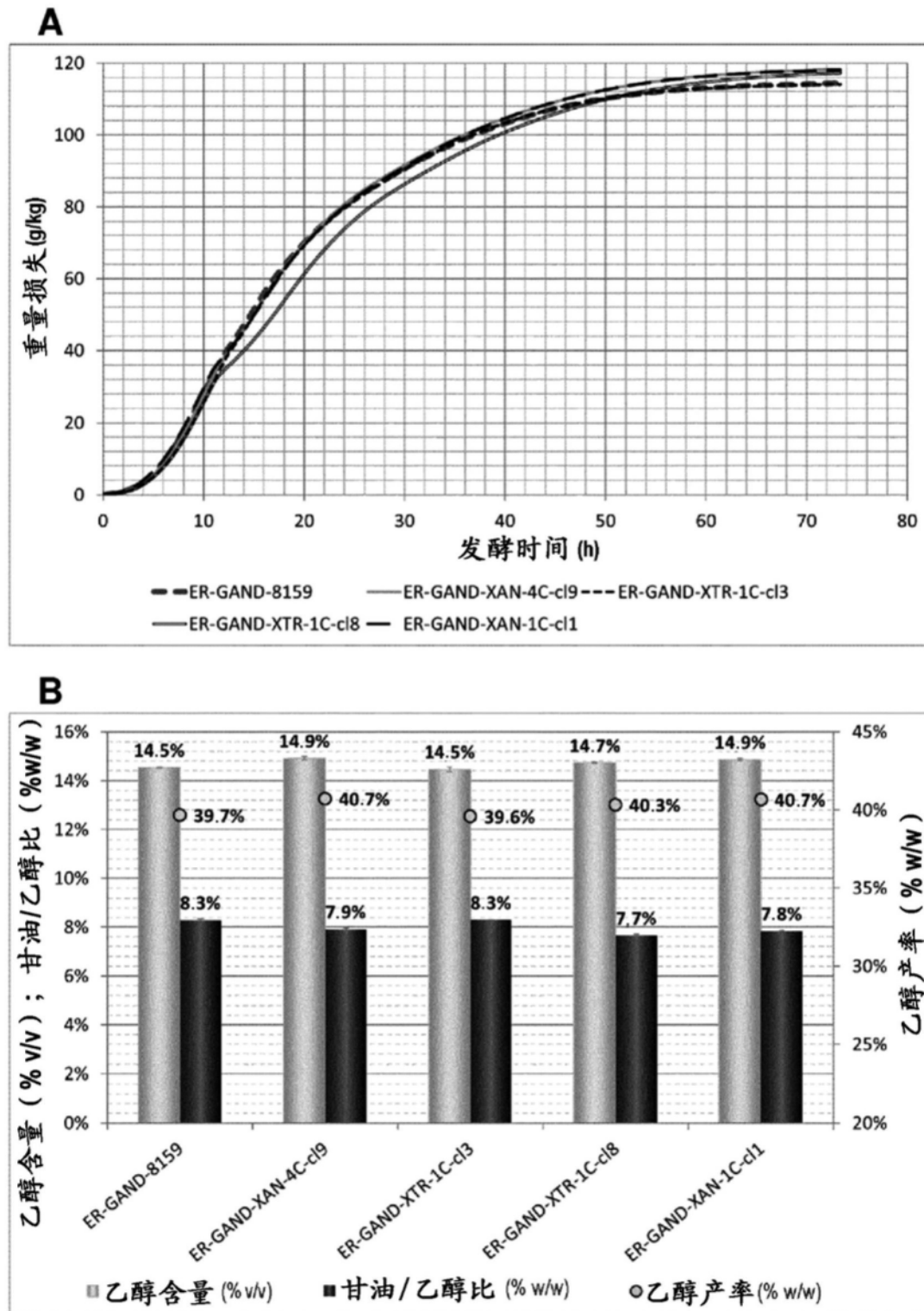


图2

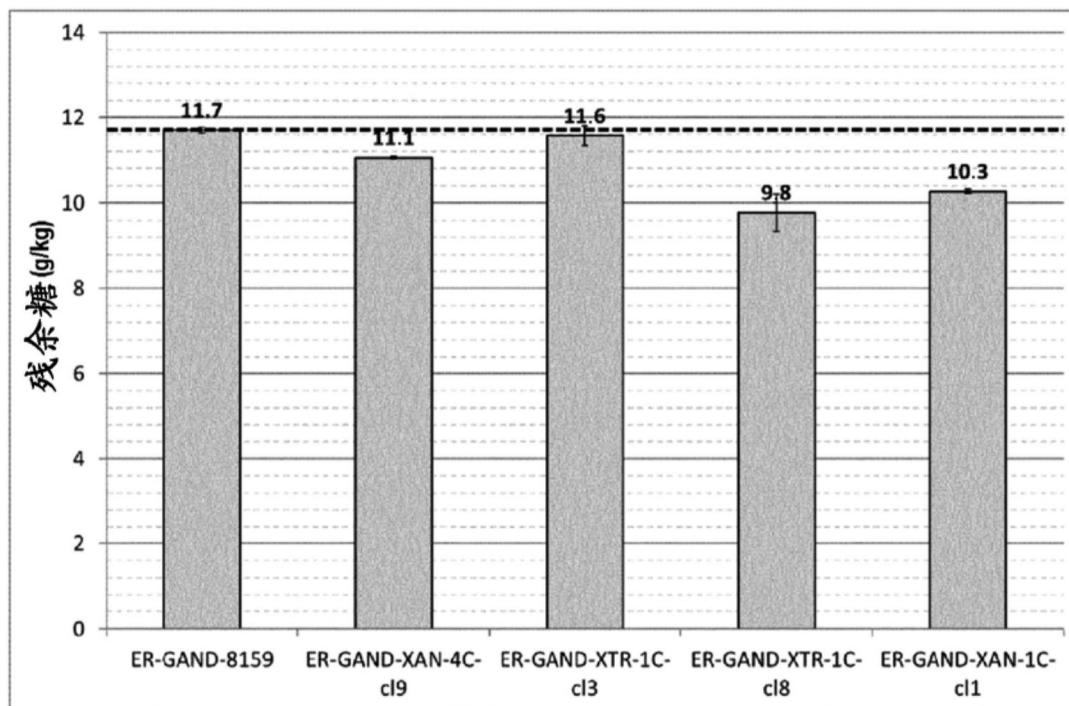


图3